

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON
ALLERGENEN UND MITOGENEN AUF THYMIDINEINBAU UND
IMMUNGLOBULIN E - SEKRETION VON LYMPHOZYTENKULTUREN
BEI PATIENTEN MIT ATOPISCHEM EKZEM UND GESUNDEN
VERGLEICHSPERSONEN**

HERBERT W. SENNER

1984

*Diss.
München*

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON
ALLERGENEN UND MITOGENEN AUF THYMIDINEINBAU UND
IMMUNGLOBULIN E - SEKRETION VON LYMPHOZYTENKULTUREN
BEI PATIENTEN MIT ATOPISCHEM EKZEM UND GESUNDEN
VERGLEICHSPERSONEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Herbert W. Senner

aus
Kösching

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatte:r: Prof. Dr. med. Dr. phil.
Johannes Ring

Mitberichterstatte:r: Prof. Dr. med. Dr. h. c.
Otto Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. med.
Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 06. 12. 1984

Gewidmet

meiner Frau Ulli
und meiner Tochter Ina



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0007

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG
 - 1.1. Der Begriff " Atopisches Ekzem "
 - 1.2. Klinik und Pathophysiologie des atopischen Ekzems
 - 1.3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit
2. MATERIAL UND METHODIK
 - 2.1. Probanden
 - 2.1.1. Patienten
 - 2.1.2. Vergleichspersonen
 - 2.2. Lymphozytentransformation
 - 2.2.1. Blutentnahme, Vorbereitung
 - 2.2.2. Lymphozytenisolierung
 - 2.2.3. Herstellung der Zellkulturen
 - 2.2.4. Ernten der Zellkulturen
 - 2.2.5. Zählung und Auswertung
 - 2.3. Bestimmung der IgE-Konzentration
 - 2.3.1. Radioimmunoassay (RIA)
 - 2.3.2. Enzymimmunoassay (EIA)
 - 2.4. Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper
 - 2.5. Reagenzien
 - 2.5.1. Mitogene
 - 2.5.1.1. Pokeweed Mitogen (PWM)
 - 2.5.1.2. Phytohämagglutinin (PHA)
 - 2.5.1.3. Concanavalin A (Con A)
 - 2.5.2. Allergene
 - 2.5.2.1. Katzenepithel
 - 2.5.2.2. Hausstaubmilbe (Dermatophagoides pteronyssinus)
 - 2.5.2.3. Gräserpollen

2.5.3. Methyl-³H-Thymidin

2.5.4. Kulturmedium

2.5.4.1. Zusammensetzung des Kulturmediums

2.5.4.2. Liste der Einzelbestandteile

2.6. Statistik

2.6.1. Statistische Tests

2.6.2. Begriffe

3. ERGEBNISSE

3.1. Methodische Voruntersuchungen

3.1.1. Lymphozytentransformationstest

3.1.1.1. Häufigkeitsverteilung und Summenhäufigkeit
der Variationskoeffizienten beim LTT

3.1.1.2. Versuche zur Kinetik des LTT

3.1.2. Quantitative Bestimmung der IgE-Antikörper

3.1.2.1. Güte des Radioimmunoassay (RIA)

3.1.2.2. Güte des Enzymimmunoassay (EIA)

3.1.2.3. Variationen der Inkubationszeiten beim RIA

3.1.2.4. Inkubation von Mitogenen mit IgE

3.1.2.5. Kinetik der in vitro IgE-Spiegel

3.2. Lymphozytentransformationstest bei Atopikern
und Vergleichspersonen

3.2.1. Stimulation mit Mitogenen

3.2.2. Stimulation mit Allergenen

3.2.3. Kombinierte Stimulation mit Mitogenen und Allergenen

3.2.3.1. Allergenkonzentration $c_1 = 10^{-1}$ der Stammlösungen

3.2.3.2. Unterschiede der kombinierten Stimulation bei
Verwendung verschiedener Allergenkonzentrationen
 $c_1 = 10^{-1}$ und $c_2 = 10^{-2}$ der Stammlösungen

3.2.4. Vergleich spezifischer IgE-Antikörper im Serum
der Patienten mit Lymphozytenstimulationen ihrer
Zellkulturen

- 3.3. In vitro IgE-Sekretion
 - 3.3.1. IgE-Konzentrationen der Zellüberstände und der Zellsuspensionen vor der Kultivierung
 - 3.3.2. Maximale und minimale in vitro IgE-Werte bei Atopikern und Kontrollpersonen
 - 3.3.3. IgE-Konzentrationen in den Überständen von Lymphozytenkulturen bei Atopikern
 - 3.3.3.1. Verteilung und Korrelation von Plasma-IgE und in vitro IgE bei Atopikern
 - 3.3.3.2. IgE-Konzentrationen nach Stimulation mit Mitogenen
 - 3.3.3.3. IgE-Konzentrationen nach Stimulation mit Allergenen
 - 3.3.3.4. IgE-Konzentrationen nach kombinierter Stimulation mit Mitogenen und Allergenen
 - 3.3.3.5. Vergleich spezifischer IgE-Antikörper im Serum mit der in vitro IgE-Sekretion nach Allergenstimulation
- 3.4. Nachweis spezifischer IgE-Antikörper in den Überständen von Lymphozytenkulturen

4. DISKUSSION

- 4.1. Vorarbeiten zur Methodik
 - 4.1.1. Begründung
 - 4.1.2. Versuche zur Kinetik
 - 4.1.2.1. Kinetik des Lymphozytentransformationstests
 - 4.1.2.2. Kinetik der IgE-Spiegel in den Überständen von Lymphozytenkulturen
 - 4.1.3. Versuche zur Methodik der IgE-Bestimmung
 - 4.1.3.1. Gütekriterien des modifizierten PRIST
 - 4.1.3.2. Gütekriterien des Enzymimmunoassay (Enzygnost)
 - 4.1.3.3. Vergleich zwischen RIA und EIA
- 4.2. Der Lymphozytentransformationstest (LTT)
 - 4.2.1. Bedeutung des LTT beim atopischen Ekzem
 - 4.2.2. Faktoren, die den LTT beeinflussen

- 4.2.3. Maßzahlen der Meßergebnisse beim LTT
- 4.2.4. Vergleich des LTT bei Atopikern und Kontrollpersonen
 - 4.2.4.1. Stimulation mit Mitogenen
 - 4.2.4.2. Stimulation mit Allergenen
 - 4.2.4.3. Stimulation mit Mitogenen und Allergenen
- 4.3. In vitro IgE
 - 4.3.1. IgE-Neusynthese in vitro
 - 4.3.2. Vergleich der in vitro IgE-Werte bei Atopikern und Kontrollpersonen
 - 4.3.3. IgE in den Zellkulturen der Patienten
 - 4.3.3.1. Stimulation mit Mitogenen
 - 4.3.3.2. Stimulation mit Allergenen
 - 4.3.4. In vivo-Stimulation der IgE-Synthese
 - 4.3.5. Ausblick
- 5. ZUSAMMENFASSUNG
- 6. LITERATURVERZEICHNIS
- 7. ANHANG
 - 7.1. Kurzbezeichnungen, Abkürzungen
 - 7.2. Liste der in vitro IgE-Werte nach Probanden
 - 7.3. Danksagung
 - 7.4. Lebenslauf

1. EINLEITUNG

1.1. Der Begriff " Atopisches Ekzem "

Die Erkrankung " Atopisches Ekzem " wurde wahrscheinlich im Jahre 1808 von Robert Willan als Prurigo-ähnlicher Zustand, verbunden mit Juckreiz, erstmals dermatologisch faßbar beschrieben (40). Sie erfuhr dann viele Bezeichnungen, die zum Teil auch heute noch gebräuchlich sind. Synonyme sind z. B. Eczéma constitutionel, Prurigo Besnier, Neurodermitis constitutionalis, Neurodermitis disseminata, Neurodermitis diffusa, endogenes Ekzem oder atopische Dermatitis.

Coca und Cooke stellten 1923 ihr Konzept der Atopie vor (21). Bald wurden Verbindungen zwischen der Dermatose und der Atopie hergestellt. Von Coca und Sulzberger wurde die Benennung " Atopische Dermatitis " vorgeschlagen (40). Um der Chronizität der Erkrankung Rechnung zu tragen, erscheint der Begriff " Atopisches Ekzem " geeigneter (13).

1.2. Klinik und Pathophysiologie des atopischen Ekzems

Das atopische Ekzem ist eine sehr häufige Hautkrankheit, an der ca. 0,5 % der Erwachsenen leiden. Unter Kindern bis zu 7 Jahren wurden in den USA in einer prospektiven Studie eine Inzidenz von 4,3 % gefunden (46). Bei Patienten, die von einer anderen Erkrankung des atopischen Formenkreises betroffen waren, trat das atopische Ekzem mit einer Häufigkeit von durchschnittlich 33 % auf - für einzelne Krankheiten aus dieser Gruppe sogar mit bis zu 50 % (Rhinitis allergica 50 %, Asthma bronchiale 43 %)

(48). Diese Zahlen beleuchten die Bedeutung des atopischen Ekzems innerhalb des dermatologischen Krankengutes.

Wichtiges diagnostisches Kriterium neben der individuellen Neigung zur Atopie ist der familiäre Hintergrund dieser Krankheitsgruppe. Schnyder (123) betrachtet ihren Vererbungsmodus als unregelmäßig dominante Vererbung der atopischen Disposition. Vererbt wird also der konstitutionell verankerte sog. " Typus neurodermiticus " (92, S. 202), auf dessen Grundlage sich eine der atopischen Krankheiten entwickelt.

Diese Sätze sind der Versuch einer ersten Annäherung an eine rätselhafte und in der Fülle ihrer Untersuchungsbe-funde verwirrende Erkrankung. Unsere bisherigen Kenntnisse über sie stellen sich dar als ein Puzzle, von dem einige größere Teile fertiggestellt sind, aber noch keinen Zusammenhang erkennen lassen, von dem Einzelstücke noch herumliegen und nicht eingepaßt werden können und von dem wichtige, verbindende Teile vielleicht sogar noch fehlen können. Es wurden im Verlauf des Studiums des atopischen Ekzems eine Reihe von Erkenntnissen gewonnen, die immer neue Aspekte und Ansätze offenbarten. Ein schlüssiges Konzept für die Pathogenese konnte aus all den vorliegenden Daten nicht erstellt werden.

Der erste, der eine umfassendere Hypothese zur Erklärung der " atopischen Abnormalität " beim Asthma bronchiale vorstellte, war Szentivanyi 1968 mit seiner Theorie der beta-adrenergen Blockade (136). Viele wichtige Zeichen und Befunde konnten mit ihrer Hilfe erklärt werden, z. B. die erhöhte Empfindlichkeit der Gefäßmuskulatur und der Pili-motoren (82), eine erniedrigte Juckreizschwelle oder die Tendenz zur Lichenifikation. In Fortführung dieser

Theorie wurde die Zentralstellung der intrazellulären Mediatorssubstanzen cAMP und cGMP beleuchtet, deren Regelkreis in vielen Untersuchungen bei Atopikern verändert gefunden wurde (17, 40, 47, 108).

Neben den pharmakologischen Abweichungen rückten die immunologischen Besonderheiten bei Atopikern in das Zentrum der wissenschaftlichen Forschung. Sowohl die humorale wie die zellvermittelte Immunität erwiesen sich in vieler Hinsicht gegenüber Gesunden als abnormal. Schon lange war bekannt, daß Patienten mit atopischem Ekzem zu besonders schweren Verlaufsformen kutaner Infektionen - insbesondere viraler, wie Eczema herpeticatum und Eczema vaccinatum - neigen. Auch Dermatophyten-Infektionen, vor allem mit *Trichophyton rubrum*, verlaufen häufig als ungewöhnlich ausge dehnte und chronische Erkrankungen (40, 72, 135). Andererseits sollen, nach der heute bevorzugten Ansicht der meisten Untersucher, bei Atopikern die Auslösung einer allergischen Kontaktdermatitis, z. B. mit DNCB, erschwert und die Rate positiver Epikutantestungen im Vergleich zu Kontrollpersonen erniedrigt sein (104). Diese klinischen Hinweise führten zu der Vermutung eines Defektes der zellvermittelten Immunität. Gestützt wurde die Hypothese durch Laboruntersuchungen, die durch neue Erkenntnisse und neue Techniken möglich wurden. Es gelang, T-Lymphozyten durch Rosettenbildung mit Schafserythrozyten von B-Lymphozyten abzutrennen; dabei wurde ein niedrigerer Anteil von T-Lymphozyten bei Atopikern als bei Normalpersonen gefunden (124, 134, 135). Durch die Entdeckung der mitogenen Eigenschaften von gewissen Substanzen konnte der Lymphozytentransformationstest entwickelt werden; bei seiner Durchführung zeigten sich Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden, wenngleich die Ergebnisse strittig und ihre Interpretation unbefriedigend blieben (47, 134, 135, 156). Neuerdings

konnten T-Zell-Subpopulationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenantigene und Membranrezeptoren charakterisiert werden (18, 19, 50, 83, 90, 106). Als Folge der Untersuchung dieser Subpopulationen bildete sich die Theorie eines Defektes der T-Suppressor-Zellen heraus (83, 133). Neben den Lymphozyten sind aber auch andere am Immungeschehen beteiligte Zellen von Veränderungen betroffen. So sind die Chemotaxis der Granulozyten und der Monozyten sowie die Freisetzung lysosomaler Enzyme in der akuten Phase der Erkrankung bei einigen Patienten abgeschwächt (40, 47, 48, 54, 111, 130).

Mit der Entdeckung des Immunglobulin E durch K. und T. Ishizaka 1966 (64, 65) wurde ein anderer Weg in der Erforschung der Atopie erschlossen. Verschiedene Autoren teilten mit, daß 80 bis 90 % der Patienten mit atopischem Ekzem einen über den normalen Wert - teilweise exzessiv - hinausreichenden IgE-Spiegel im Serum aufwiesen. Dabei bestand eine grobe Korrelation zwischen dem Grad der Erkrankung und der Höhe der IgE-Konzentration. Besonders hohe IgE-Werte wurden erreicht, wenn die Patienten gleichzeitig an einem atopischen Ekzem und einer allergischen respiratorischen Erkrankung (ARD) litten (15, 26, 72, 73, 84, 148). Auf die Verbindung zwischen atopischem Ekzem, bzw. Hautkrankheiten, die von einem atopischen Ekzem nicht zu unterscheiden sind, und erhöhten Serum-IgE-Spiegeln wiesen Buckley und Becker hin. Sie nannten das Wiskott-Aldrich-Syndrom, den selektiven IgA-Mangel oder das von ihnen definierte " Hyper-IgE-Syndrom " (bei dem die Läsionen denen des atopischen Ekzems gleichen, aber nicht in der klassischen Form verteilt sind). Andererseits mußten sie einräumen, daß es Erkrankungen gibt, die mit erhöhten IgE-Konzentrationen und T-Zell-Defekten einhergehen, ohne daß bisher atopische Erscheinungen bei diesen Patienten beob-

achtet werden konnten, z. B. das Di-George-Syndrom oder das Nezelof-Syndrom (15).

Ring (109, 110) näherte sich der Problematik des atopischen Ekzems von einer anderen Seite und versuchte eine Synthese der wichtigsten Befunde, indem er die Freisetzung vasoaktiver Substanzen, z. B. Histamin, Serotonin oder Leukotrienen, als den wichtigsten, zentralen Faktor in der Pathogenese ansah. Alle anderen genannten Tatbestände konnten sie auslösen und sie verstärken, schließlich im Sinne einer positiven Rückkopplung nach Abb. 1 zu einem Teufelskreis führen. Exogenen und/oder endogenen Allergenen käme nach diesem Modell eine Bedeutung als mögliche Auslöser der Erkrankung zu. Bivalente Antigene führen nach der Bindung an IgE-Moleküle, welche an den IgE-Rezeptoren der Mastzellen und der Basophilen haften, zu einer Brückenbildung zwischen zwei IgE-Antikörpern. Dieses Signal verursacht die Ausschüttung der vasoaktiven Substanzen aus den zytoplasmatischen Speichern der Zellen. Entscheidend für den Start dieser Vorgänge ist, wie Ishizaka et al. nachweisen konnten (66), die Überbrückung zweier membranständiger IgE-Rezeptoren (Bridging-Theorie). Er gelingt beispielsweise auch durch bivalente Antirezeptor-Antikörper.

Von verschiedenen Autoren wird die Bedeutung von Allergenen bei der Entstehung des atopischen Ekzems betont; sie beziehen sich dabei auf Staub, Schimmel, Pollen, Nahrungsmittel oder sogar menschliche Kopfschuppen (1, 2, 40). Auch die Möglichkeit einer Autoimmunerkrankung wird erwogen (40). Inwieweit Antigene und IgE tatsächlich an der Pathogenese dieser Krankheit ursächlich beteiligt sind, bleibt nach wie vor im Dunkeln.

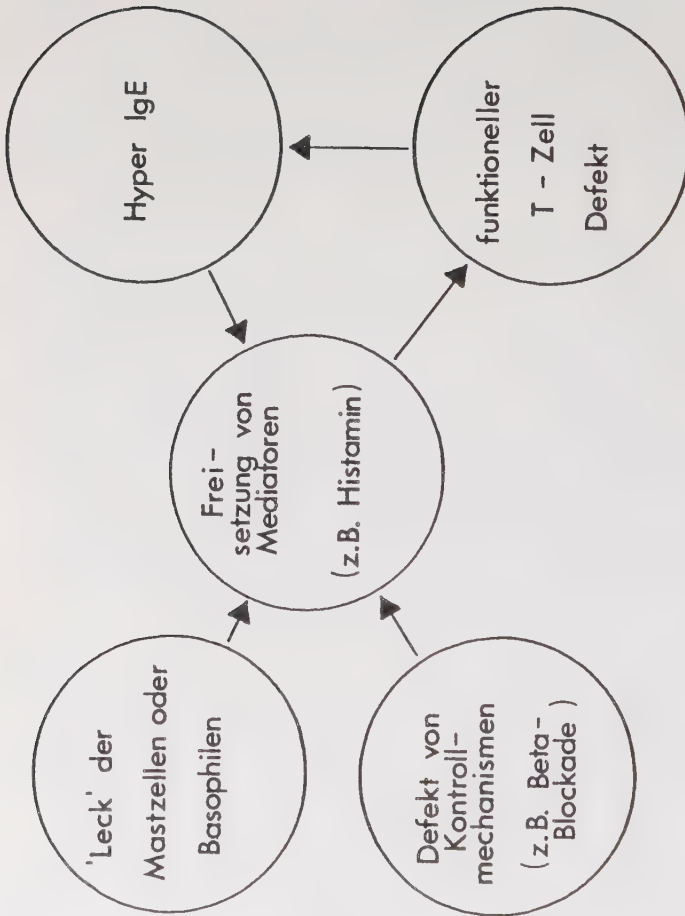


Abb. 1: Teufelskreis der Faktoren, die eine fortgesetzte Freisetzung vasoaktiver Substanzen bei Atopikern begünstigen (n. Ring, 109)

1.3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Eine wesentliche Rolle bei der Erforschung der Zusammenhänge zwischen IgE und lymphozytärem System spielten in vivo Versuche an Tieren, vor allem mit Mäusen und Ratten (64, 65, 80). In den letzten Jahren wurde mit Nachdruck versucht, auch Erkenntnisse über die IgE-Regulation humaner Zellen zu gewinnen. Da es sich verbietet, am Menschen Versuche mit potentiell gefährlichen Stoffen in vivo durchzuführen, verlegte man sich darauf, Modelle in vitro zu entwickeln. Tatsächlich zeigte es sich, daß Lymphozyten sehr gut kultiviert werden und ihre Reaktionen beobachtet werden konnten.

Auch die vorliegende Arbeit behandelt Versuche mit menschlichen Zellen in vitro. Sie gliedert sich in zwei große Abschnitte, von denen der erste sich mit der DNA-Synthese von Lymphozytenkulturen unter unterschiedlichen Bedingungen beschäftigt. Als Maß für die DNA-Synthese verwendeten wir eine autoradiographische Methode, den ^3H -Thymidineinbau. Wir wollten, ausgehend von der Hypothese eines T-Zell-Defekts bei Atopikern, überprüfen, ob sich durch Stimulation der Lymphozyten mit verschiedenen Mitogenen, die entweder auf B-Lymphozyten oder T-Lymphozyten wirken, Unterschiede zwischen Erkrankten und Kontrollpersonen ausmachen ließen. Gleichzeitig stimulierten wir die Zellen mit Allergenen, um deren Einfluß auf die DNA-Synthese, entweder im Vergleich mit einer Leerkultur oder im Vergleich mit einer Mitogenkultur, erfassen zu können. Auch dabei richteten wir unser Augenmerk vor allem auf Unterschiede zwischen Patientengruppe und Normalkollektiv.

Im zweiten Teil stehen die Immunglobulin E-Konzentrationen in den Überständen der Zellkulturen im Mittelpunkt der Er-

örterung. Wir konzentrierten uns hier vorrangig auf die Atopikerggruppe, bei der die Möglichkeit der Beeinflussung der IgE-Spiegel durch Mitogene und Allergene einer Prüfung unterzogen wurden.

Neben diesen Hauptteilen wurden methodische Vorarbeiten zu beiden Untersuchungsmethoden notwendig. Es sollten in einem Kulturansatz sowohl der ^3H -Thymidineinbau wie die IgE-Sekretion gemessen werden. Aus diesem Grund führten wir für beide Verfahren voneinander getrennte Untersuchungen zur Kinetik durch, um eine Entscheidung über die am besten geeignete Inkubationszeit treffen zu können.

Um über die Fähigkeit, die in vitro erwarteten, kleinen IgE-Werte genau und zuverlässig zu bestimmen, unseres hauptsächlich verwendeten RIA Auskunft zu erhalten, wurden bekannte IgE-Konzentrationen bestimmt und die Meßwerte mit den Erwartungswerten verglichen. Gleichartige Experimente wurden auch mit einem EIA vorgenommen; die Ergebnisse beider Nachweismethoden wurden gegeneinander abgewogen. Beim RIA variierten wir im 1. Schritt die Inkubationszeiten mit der Frage, ob niedrige IgE-Spiegel dadurch besser meßbar seien.

Die für unser Thema wichtigsten Fragen seien an dieser Stelle kurz zusammengefaßt:

1. Gibt es Unterschiede des LTT zwischen Patienten mit atopischem Ekzem und gesunden Kontrollpersonen? Sind sie bei verschiedenen Mitogenen anders ausgeprägt?
2. Können Allergene die Zellen von Patienten besser stimulieren als die von Kontrollpersonen?
3. Beeinflussen Allergene die Mitogenstimulation? Unter-

scheiden sich bei kombinierter Stimulation die Reaktionen der Zellen von Patienten und Kontrollpersonen?

4. Wird IgE in vitro synthetisiert?
5. Kann in den Kulturen der Patienten mehr IgE nachgewiesen werden als in denen der Kontrollpersonen?
6. Korrelieren Plasma-IgE und in vitro IgE?
7. Wie beeinflussen Mitogene und Allergene die IgE-Bestimmungen in den Kulturen?
8. Kann durch Allergene die IgE-Sekretion in vitro stimuliert werden? Werden nach Stimulation mit Allergenen spezifische IgE-Antikörper freigesetzt?
9. Findet sich eine Beziehung zwischen spezifischen IgE-Antikörpern im Serum eines Patienten und den Reaktionen seiner Zellkulturen im LTT bzw. in der IgE-Sekretion gegenüber den entsprechenden Allergenen?

2. MATERIAL UND METHODIK

Die Versuche wurden in der Zeit von Februar 1981 bis August 1982 in der Dermatologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco) durchgeführt.

2.1. Probanden

2.1.1. Patienten

In die Patientengruppe wurden insgesamt 15 Patienten aufgenommen. Davon waren sechs Personen weiblichen, neun männlichen Geschlechts. Der Altersdurchschnitt betrug $30,9 \pm 15,1$ Jahre ($\bar{x} \pm s$), die Variationsbreite 18 bis 68 Jahre. 13 Patienten waren wegen der Schwere ihrer Erkrankung in stationärer Behandlung in der Dermatologischen Klinik der Universität München. Zwei wurden ambulant in der Poliklinik betreut.

Für die Zeit von mindestens einem Monat vor unserer Untersuchung hatte kein einziger Patient systemisch Glukokortikoide bekommen, eine lokale Behandlung mit steroidhaltigen Externa mußte bei fast allen in Kauf genommen werden. Einige Patienten erhielten gegen ihren Juckreiz Antihistaminika (H_1 -Blocker).

Wichtigste Kriterien für die Stellung der Diagnose " Atopisches Ekzem " waren der Hautbefund und die Anamnese des Patienten. Daneben fahndeten wir nach den typischen Stigmata der Atopiker. Für die Diagnose spielten laborchemische Daten keine Rolle.

Die wesentlichen soziographischen, anamnestischen und laborchemischen Daten sind in Tab. 1 angeführt. Jedem Patienten wurde eine feste Nummer zugeteilt, die der Reihenfolge der Untersuchung innerhalb der Patienten-gruppe entspricht. Die Nummern wurden in allen in der Arbeit vorkommenden Tabellen beibehalten. Das Alter der Versuchspersonen ist in Jahren zum Zeitpunkt der Untersuchung angegeben. Das Geschlecht ist abgekürzt mit m für männlich und w für weiblich.

Jeder Patient wurde nach dem Auftreten von Milchschorf im Kleinkindesalter, nach dem Vorkommen von Asthma bronchiale und Rhinitis allergica - gleichgültig, ob im zeitlichen Zusammenhang mit Ekzemen oder unabhängig davon und gleichgültig, ob die Erkrankungen zum Zeitpunkt der Untersuchung noch bestanden oder nicht - gefragt.

Die Familienanamnese wurde als positiv (+) angesehen, wenn ein Verwandter ersten oder zweiten Grades an einer atopischen Erkrankung litt. Negativ (-) wurde sie bewertet, wenn keine Atopien aufgetreten waren, und als nicht bekannt (?) eingestuft, wenn der Patient keine Angaben machen konnte.

Der Schweregrad des Ekzems wurde nach der Ausdehnung in drei Grade eingeteilt:

Schweregrad 1 (+): Das Ekzem beschränkte sich auf eine Körperregion, z. B. nur die Hände, das Gesicht, die Kniekehlen.

Schweregrad 2 (++): Es waren mehrere Körperregionen, mindestens zwei verschiedene Areale befallen.

Schweregrad 3 (+++): Befall des gesamten Integuments.

In der Spalte "Therapie" sind die gegen das atopische Ekzem gerichteten Behandlungsmaßnahmen aufgeführt. Sie sind unterschieden nach der systemischen Therapie mit Antihistaminika und der externen Therapie, die entweder indifferent (ind.) oder mit Steroidhormonen (S) durchgeführt wurde.

Die Plasma-IgE-Werte wurden zur Zeit unserer Untersuchung bestimmt.

Zur gleichen Zeit wurde im Plasma eines jeden Patienten nach spezifischen IgE-Antikörpern gegen die Allergene gesucht, die bei den Zellkulturen in vitro eingesetzt wurden. Das quantitative Ergebnis ist nach den gebräuchlichen RAST-Klassen eingeteilt. Die Antikörper wurden mit kleinen Buchstaben abgekürzt; es bedeuten k Antikörper gegen Katzenepithel, d Antikörper gegen Hausstaubmilbe (Dermatophagoides pteronyssinus) und g Antikörper gegen Gräserpollen.

Bei nur einem Patienten war uns bekannt, daß Hauttests auf Standards von Aeroallergenen positiv ausgefallen waren. Es war dies der Patient mit der Nummer 8, der sensibel war gegen Hausstaubmilbe und Schimmelpilze. Die übrigen Patienten konnten entweder wegen ihrer Hautveränderungen zur Zeit der Untersuchung nicht getestet werden, oder die Allergene waren ihnen trotz positiver Ergebnisse nicht bekannt, oder es waren aus unbekannten Gründen noch keine Hauttests durchgeführt worden.

2.1.2. Vergleichspersonen

Um in die Kontrollgruppe aufgenommen zu werden, mußten die Probanden mehrere Voraussetzungen erfüllen:

Nr.	Patient	Alter	Ge- schlecht		Schwere- grad	Eigenanamnese			Familien- anamnese	Therapie		Plasma-IgF (U/ml)	spez. IgF-Antikörper RAST-Klasse		
			m	w		Milch- scharf	Asthma	Heu- schupfen		Anti- histamin	extern		k	d	g
1	S.D.	39	x		++	+	+	+	-	+	S	7 900	0	2	4
2	S.H.	23		x	+	+	-	-	+	-	ind.	3 600	3	2	4
3	O.E.	38	x		+++	+	-	-	?	-	S	17 000	3	3	4
4	A.U.	18		x	+++	+	-	-	+	+	S	492	0	0	0
5	F.A.	68	x		+++	+	-	-	+	-	S	3 350	0	2	0
6	J.W.	19	x		+	-	-	+	+	-	S	252	0	0	0
7	C.V.	40	x		++	+	+	+	+	-	S	4 750	0	4	4
8	K.D.	29	x		+++	+	-	-	-	-	S	15 200	3	2	1
9	W.J.	55	x		+++	-	-	-	?	-	S	690	0	0	0
10	S.C.	19		x	++	+	-	-	+	-	S	608	0	4	4
11	R.C.	19		x	+++	+	+	+	+	-	ind.	2 100	4	2	3
12	K.T.	22		x	++	+	-	+	+	-		7 800	0	1	3
13	K.M.	36		x	+++	-	-	-	+	+	S	650	0	0	0
14	K.G.	20		x	+	-	-	-	-	+	S	430	0	0	1
15	G.B.	19		x	++	+	+	-	+	-	S	1 450	3		
Σ		30,9	Summe												
		15,1	9	6											

Tab. 1: Soziographische, anamnestische und laborchemische Daten der Patienten mit atopischem Ekzem. Erläuterung s. S. 15 und 17.

Nr.	Proband	Alter	Geschlecht		Plasma-IgE (U/ml)
			m	w	
16	H.R.	23		x	5
17	F.R.	28		x	23
18	R.A.	22		x	57
19	M.E.	47		x	52
20	B.D.	20	x		75
21	M.J.	25	x		84
22	H.S.	28	x		22
23	W.J.	48	x		14
24	R.A.	38	x		12
25	A.J.	24	x		12
26	O.K.	42	x		50
27	S.U.	27	x		63
28	A.U.	27		x	60
29	S.K.	24		x	57
$\bar{x}$		30,2	Summe		41,9
s		9,4	8	6	26,2

Tab. 2: Soziographische Daten und Plasma-IgE-Wert der Kontrollpersonen

1. Sie durften keine Anamnese für atopische Erkrankungen aufweisen. Darunter verstanden wir das Fehlen von Ekzemen, von Asthma, von Rhinitis und Konjunktivitis allergica, von Heufieber und von Urtikaria.
2. Ihr Plasma-IgE-Spiegel mußte kleiner sein als 100 U/ml.
3. Die spezifischen IgE-Antikörper gegen Katzenepithel, gegen Hausstaubmilbe und gegen Gräserpollen mußten negativ sein, d. h. es mußte die RAST-Klasse 0 bei den entsprechenden Allergenen gemessen worden sein.

Insgesamt wurden schließlich 14 Personen als der Kontrollgruppe zugehörig untersucht. Sie erhielten die Nummern 16 bis 29, die Reihenfolge entspricht der zeitlichen Folge der Versuche innerhalb der Gruppe.

2.2. Lymphozytentransformationstest

2.2.1. Blutentnahme, Vorbereitung

Aus arbeitstechnischen Gründen wurden die Blutproben nur an einem Montag, einem Dienstag oder einem Freitag entnommen. Es konnten an einem Tag die Kulturen von jeweils nur zwei Versuchspersonen vorbereitet werden.

Von jeder Versuchsperson wurden 20 ml Blut aus der Kubitalvene in sterile Einmalspritzen entnommen und mit 0,2 ml stabilisatorfreiem Heparin (5000 IU/ml, Novo Industries) versetzt. Die Blutentnahme erfolgte jedesmal zwischen 9⁰⁰ und 10⁰⁰ Uhr morgens, die Probanden waren nicht nüchtern.

Alle für den Versuchsansatz benötigten Reagenzien und Lösungen wurden im Wasserbad auf 37° C vorgewärmt. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme verarbeitet.

2.2.2. Lymphozytenisolierung

Die peripheren mononukleären Zellen wurden nach Boyum (11) über einen Dichtegradienten aus dem Blut isoliert. Wir verwendeten dabei Ficoll-Hypaque^R, die Kombination des hochmolekularen Polysacchyrids Ficoll und einer Jodamidlösung (3-Acetamido-2,4,6-trijod-5-N-methyl-acetamido-acetat). 5 ml des vorgewärmten Ficoll-Hypaque wurden in jeweils ein 12 ml fassendes, steriles Kunststoffröhrchen

abgefüllt, darüber wurden vorsichtig in langsamem Fluß 5 ml des heparinisierten Blutes geschichtet. Für jeden Probanden wurden vier Säulen zubereitet.

Die Röhrchen wurden bei 2600 Rpm und 37° C 20 Minuten lang zentrifugiert, der Rotor durfte nach Beendigung der Zentrifugation nicht abgebremst werden. Es fanden sich dann die Phasen der Abbildung 2 in den Röhrchen.

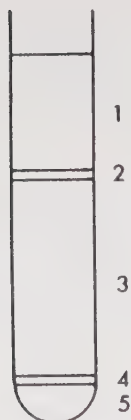


Abb. 2: Phasen nach Dichtezentrifugation von Blut über Ficoll-Hypaque^R

1 = Plasmaüberstand

2 = Lymphozytenring

3 = Ficoll-Hypaque^R

4 = Granulozyten

5 = Erythrozytensediment

Das über dem Lymphozytenring stehende Plasma wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, ein Teil davon wurde für die spätere IgE-Bestimmung (Plasma-IgE-Wert) in Plastikröhrchen aufbewahrt und eingefroren, der Rest wurde verworfen. Der Überstand wurde soweit wie möglich entfernt, bevor die Lymphozyten abpipettiert wurden, um die Menge der Immunglobuline in den Zellsuspensionen zu Beginn der Kultivierung möglichst gering zu halten. Besonders bei den Atopikern traten häufig sehr hohe Plasma-IgE-Spiegel auf, die, wenn der Plasmaüberstand mit in die Waschlösung aufgenommen wurde, durch die routinemäßigen

Verfahren nicht vollständig entfernt wurden. Sie wurden dann nur verdünnt, so daß sie möglicherweise die Reaktionen der Zellen in den Kulturen beeinflussen konnten.

Mit Hilfe einer neuen sterilen Pasteurpipette wurde der Lymphozytenring in ein anderes, steriles Kunststoffröhrchen überführt, mit 10 ml Waschlösung aufgeschwemmt und gut vermischt. Diese Zellsuspension wurde 10 Minuten lang bei 1200 Rpm und 37° C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Der Waschvorgang wurde unter den gleichen Bedingungen wiederholt, der Überstand wurde wiederum weitgehend entfernt. Die als Sediment verbliebenen mononukleären Zellen wurden in einem 50 ml fassenden, sterilen Plastikröhrchen aufgenommen, mit Kulturmedium auf 10 ml aufgeschwemmt und gut vermischt.

Ein Tropfen dieser Zellsuspension wurde auf einen Objektträger gegeben; daraus wurde die Zellaufschwemmung und 3 %-ige Essigsäure im Verhältnis 1:20 in eine Leukopipette aufgezogen. Auf einem elektrischen Schüttler wurde der Inhalt der Pipette fünf Minuten lang gut durchmischt, anschließend nach den Vorschriften der Leukozytenzählung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt.

Mit Kulturmedium wurde die Zellsuspension so verdünnt, daß sich in 1 ml Medium 10^6 Zellen befanden.

2.2.3. Herstellung der Zellkulturen

Alle Zellkulturen wurden in Dreifachansätzen (Triplicates) gezüchtet. Am Tag 0 wurden 200 µl der vorbereiteten Zellsuspension mit 20 µl Mitogenlösung und 20 µl Allergenlösung eingesetzt. Zur Verteilung der verschiedenen Lösungen wurden entsprechende Dispenser (Fa. Hamilton) verwendet.

Bei der nicht stimulierten Kultur K_0 (Leerkultur) und bei den allein durch Mitogene bzw. durch Allergene stimulierten Kulturen wurden an Stelle der Mitogen- bzw. Allergenlösungen Hanks'sche Lösung einpipettiert.

Als Kulturplatten fanden die Platten der Fa. Bioplast Verwendung, die runde Böden besaßen und zu je zwei Platten steril verpackt waren. Die äußeren Randleisten der Platten wurden nicht beimpft, um einer Verdunstung zu begegnen. Pro Proband waren für die Versuchsansätze zwei Kulturansätze notwendig, die nach dem Schema der Abb. 3 beschickt wurden.

Die Reste der Zellsuspensionen, die nicht für die Kulturen gebraucht wurden, wurden in je zwei Plastikröhrchen aufgeteilt, von denen das eine bei -80°C tiefgefroren wurde. Das andere wurde bei 1200 Rpm und Raumtemperatur 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand wurde in ein weiteres Plastikröhrchen überführt und dann ebenfalls bei -80°C eingefroren. Aus den beiden Proben wurden später die IgE-Konzentrationen der Überstände (IgE_0) und der Zellsuspensionen (IgE_x , $x = 1, \dots, 5$) zur Zeit 0 nach ein- bis fünfmaligem Einfrieren und Auftauen bestimmt.

Am Tag 3 des Versuchs wurden nach 70 ± 2 Stunden nach dem Kulturbeginn $20\text{ }\mu\text{l}$ ^3H -Thymidinlösung den Zellkulturen zugegeben. Nach dieser Zeit ist mit einer maximalen Einbaurate des Tracers zu rechnen (9, 19). Nach dem Beimpfen wurden die Zellkulturen in den Brutschrank (Fa. Heraeus) gestellt. Im Brutschrank herrschte eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre, die Temperatur lag bei 37°C . Er wurde dauernd mit 5 % CO_2 begast, um einen konstanten pH zu gewährleisten.

Alle Arbeiten wurden unter einem Laminar-Air-Flow verrich-

H	G	F	E	D	C	B	A	1
-	/	-	PWM				ConA/G1	2
		PHA	Con A				K1	3
PWM	/	K1	PWM	/	K2		K3	4
		/	D1		D1		D2	5
		/	G1		G2		G1	6
PHA	/	K1	PHA	/	K2		G3	7
		/	D1		D2			8
		/	G1		G2			9
ConA	/	K1	ConA	/	K2			10
		/	D1		D2			11
								12

H	G	F	E	D	C	B	A	1
		ConA	/	G1			ConA/G2	2
			K1				K2	3
			K3				D1	4
			D2				D3	5
			G1				G2	6
			G3					7
								8
								9
								10
								11
								12

Abb. 3: Schema der Beschickung der Kulturplatten. Abkürzungen s. Anhang S. 224/225.
 In einer horizontalen Reihe waren je zwei Triplicates angeordnet, die äußeren Vertiefungen aller vier Seiten blieben frei. In den ersten drei Vertiefungen der ersten Platte (-/-) wurden weder Mitogene noch Allergene eingesetzt.

tet, um die Wahrscheinlichkeit der Kontamination durch Bakterien oder Pilze zu verringern.

2.2.4. Ernten der Zellkulturen

Am Tag der Ernte wurden die Mikrotiterplatten bei 1200 Rpm und Raumtemperatur 10 Minuten lang zentrifugiert (Labofuge II, Fa. Heraeus Christ). Die Überstände der einzelnen Vertiefungen wurden abpipettiert, wobei die der Triplicates in je einem Polystyrolröhrchen zusammengefaßt wurden. Die Röhrchen wurden mit Klebeband verschlossen und für die spätere IgE-Bestimmung aus dem Überstand der Kulturen bei - 80° C tiefgefroren. Aus arbeitstechnischen Gründen konnte die IgE-Messung nicht sofort durchgeführt werden.

Die Mikrotiterplatten mit dem Zellsediment wurden ebenfalls bei - 80° C tiefgefroren und nach einer Stunde wieder aufgetaut. Dieser Arbeitsgang sollte die Zellmembranen zerstören, so daß dann nur die nackten Zellkerne geerntet wurden. Das von Harrison et al. (49) beschriebene Verfahren wurde für die Ernte in modifizierter Form angewandt. Mit Hilfe eines Erntegerätes (Cell Harvester, Bimba MFG Co., Monee, Ill., USA) wurden die Kerne auf einen Glasfilterstreifen (Schleicher u. Schüll, Nr. 2) gesaugt, die Plattenvertiefungen wurden mehrmals mit Aqua dest. gespült. Dabei wurden zum einen die noch an den Wänden der Vertiefungen haftenden DNA-haltigen Strukturen abgelöst, zum anderen im Filterstreifen unspezifisch gebundenes ³H-Thymidin ausgewaschen. Die Filterstreifen wurden in der Luft getrocknet, anschließend wurden die mit den Zellproben behafteten Stellen mit einer Pinzette sorgfältig ausgelöst. Die entstandenen Plättchen wurden in Szintillationsröhrchen gegeben, in die darauf mit Hilfe eines Dispensers je 2 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Rotis-

zint) verteilt wurden. Die Szintillationsröhrchen wurden mit einer Plastikkappe verschlossen und in als Adapter wirkende, größere Plastikröhrchen gestellt.

2.2.5. Zählung und Auswertung

Im Packard-Counter (TRI-CARB-Flüssigkeitsszintillationszähler, Modell 3380, Packard Instrument Company, Inc., Downers Grove, Ill, USA) wurden die Proben fünf Minuten lang gezählt. In unsere Berechnungen ging der Minutenwert ein, der sich als Durchschnittswert der Fünfminutenwertes errechnete.

Aus den je drei Meßwerten der Triplicates wurden die Mittelwerte ($\bar{x}$), ihre Standardabweichungen (s) und ihre Variationskoeffizienten ($VK = s:\bar{x} \cdot 100(\%)$) ermittelt.

Für den Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe wurden die Mittelwerte der Triplicates herangezogen, wobei der Wert der nicht stimulierten Kultur K_0 von den Werten der mit Mitogenen stimulierten Kulturen abgezogen wurde.

2.3. Bestimmung der IgE-Konzentration

Die zur Zeit am häufigsten verwendeten Methoden der IgE-Bestimmung sind der Radioimmunoassay (RIA) und der Enzymimmunoassay (EIA). Für unsere Versuche verwendeten wir hauptsächlich einen Radioimmunoassay (Phadebas-PRIST, Pharmacia, Freiburg), den wir in verschiedenen Modifikationen einsetzten.

In einer Versuchsreihe haben wir den RIA mit einem Enzymimmunoassay (Enzygnost-Test^R, Behringwerke AG, Marburg)

verglichen.

2.3.1. Radioimmunoassay (RIA)

Der Phadebas-PRIST arbeitet nach dem Sandwichprinzip. Es werden Anti-IgE-Antikörper kovalent an Papierscheiben gebunden. Diese Papierscheiben sind vom Hersteller fertig präpariert. Bei der ersten Inkubation mit IgE-haltigem Serum reagieren die Immunglobuline E mit den Anti-IgE-Antikörpern. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Auswaschen entfernt. Danach werden mit ^{125}J markierte Anti-IgE-Antikörper inkubiert, die mit den an den Papierscheiben adsorbierten Komplexen Bindungen eingehen. Überzähliges ^{125}J -Anti-IgE wird wiederum ausgewaschen. Die Radioaktivität der Proben ist dann proportional der IgE-Konzentration. Mit Hilfe von Standards wird eine Eichkurve erstellt, an der man die IgE-Konzentrationen unbekannter Seren bzw. Lösungen ablesen kann.

Für die Ermittlung der Eichkurve des RIA wurden für unsere Versuche die in den handelsüblichen Kits enthaltenen Standards mit 0,5 U/ml, 1 U/ml, 2,5 U/ml und 7,5 U/ml eingesetzt. Als 0 U/ml wurde der IgE-freie Verdünner (IgE-freies Pferdeserum) bestimmt. Jeder Standard wurde doppelt angesetzt.

Die Versuchsdurchführung gestaltete sich so, daß zuerst die vom Hersteller präparierten, mit Anti-IgE-Antikörpern beladenen Papierscheiben in vorbereitete, beschriftete Polystyrolröhrchen eingelegt wurden. Darauf wurden je 100 µl der zu untersuchenden Lösung (Standard oder unbekannte Lösung) so einpipettiert, daß die Papierscheiben vollständig von der Flüssigkeit bedeckt wurden. Die Röhrchen wurden mit einer Folie abgedeckt und 24 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Am zweiten Tag wurden

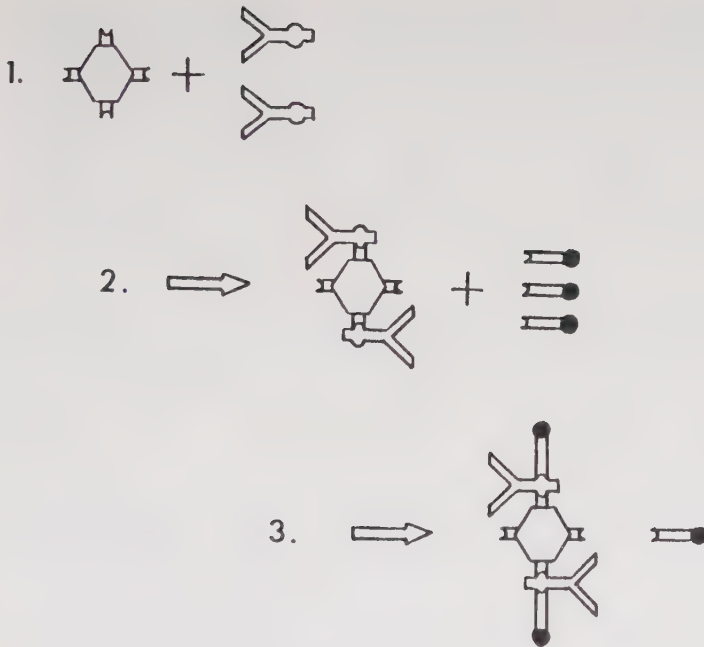


Abb. 4: Prinzip des Phadebas-PRIST

1. Schritt: Inkubation von IgE (beliebige Fab) mit an Papierscheiben gebundenen Anti-IgE-Antikörpern

2. Schritt: Auswaschen des nichtgebundenen IgE. Inkubation mit radioaktiv markierten Anti-IgE-Antikörpern.

3. Schritt: Auswaschen des überzähligen, radioaktiven Antikörpers. Bestimmung der Radioaktivität im Gamma-Counter.

die Röhrchen mit einer mitgelieferten Waschlösung zweimal gewaschen; nach dem zweiten Waschen mußten alle Flüssigkeitsreste sorgfältig aus den Röhrchen abgesaugt werden. Nun wurden je 100 µl der ^{125}J -Anti-IgE-Lösung in die Röhrchen eingebracht, diese wurden mit Folie verschlossen und bei Raumtemperatur für weitere 24 Stunden belassen. Nach der zweiten Inkubationsperiode wurden die Testansätze nochmals zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Röhrchen in den Gamma-Counter eingeführt und ihre Radioaktivität bestimmt. Jedes Röhrchen wurde zweimal eine Minute lang gezählt; der Mittelwert der beiden Zählwerte wurde für unsere Bestimmungen als Testergebnis des betreffenden Röhrchens herangezogen.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde der Großteil der Proben untersucht. In einigen Versuchen zur Meßmethodik variierten wir allerdings die Inkubationszeiten des ersten Schrittes, bei dem die Bindung des in der Lösung enthaltenen IgEs an das an der Papierscheibe fixierten Anti-IgE erfolgt. Es wurden drei Versuchsreihen mit den gleichen Proben durchgeführt; die Inkubationszeiten des ersten Schrittes betrugen drei Stunden, 24 Stunden und sieben Tage. Alle übrigen Arbeitsgänge waren identisch mit den zuvor beschriebenen.

2.3.2. Enzymimmunoassay (EIA)

Im Unterschied zum RIA sind bei dem von uns benutzten EIA die Anti-IgE-Antikörper nicht kovalent an Papierscheiben gebunden, sondern physikalisch an Polystyrolröhrchen fixiert. Die ersten Arbeiten erfolgen wie beim RIA: Zugabe der Proben, Inkubation und Auswaschen. Als Marker wird an Stelle eines radioaktiv markierten Anti-IgE-Antikörpers ein mit einem Enzym (Peroxidase) beladener Antikörper verwendet. Nach der Inkubation der Proben mit dem Marker

wird dem System Substrat zugegeben, das vom Enzym in ein Produkt umgesetzt wird, welches entweder sofort oder nach Reaktion mit einem Indikator (Chromogen) durch Photometrie bestimmbar ist. Die Reaktionen werden nach bestimmten Zeiten durch Proteindenaturierung beendet. Die IgE-Konzentrationen sind bei dieser Meßmethode der Menge des umgesetzten Substrats und damit der Extinktionsänderung proportional.

Für den von uns benutzten EIA wurden vom Hersteller Standards mit IgE-Konzentrationen zwischen 10 U/ml und 1000 U/ml bereitgestellt. Die gelieferten Lösungen mußten dabei grundsätzlich vor Testbeginn im Verhältnis 1:10 verdünnt werden, um die angegebenen Konzentrationen zu erreichen. Für unsere Bedürfnisse - wir wollten IgE-Konzentrationen in der Größenordnung von 0,1 U/ml bis etwa 10 U/ml messen - waren folglich noch weitere Verdünnungen erforderlich, um geeignete Standards zu erhalten. Wir stellten Eichlösungen mit den IgE-Konzentrationen 0,5 U/ml, 1,0 U/ml, 2,5 U/ml, 5 U/ml und 7,5 U/ml her. Als Standard mit der IgE-Konzentration 0 U/ml setzten wir das Inkubationsmedium ein.

Nach den Anweisungen des Herstellers mußten sämtliche Proben mit Inkubationsmedium eingesetzt werden, so daß sie mindestens im Verhältnis 1:2 verdünnt werden mußten (und damit die ohnehin schon sehr niedrigen IgE-Spiegel als Folge der Testvorschriften noch weiter erniedrigt wurden).

In jedes Teströhrchen wurden 200 µl der so vorbereiteten Standardlösung bzw. Probe einpipettiert. Die Standards wurden als Doppelansätze, die Proben als Dreifachansätze geführt.

Die Röhrchen wurden mit Klebefolie abgedeckt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Röhrchen mit Waschlösung zweimal gewaschen, anschließend wurden 200 µl der Anti-IgE-Peroxidase-Konjugat-Lösung (Anti-IgE vom Kaninchen) eingefüllt. Nach einer erneuten Inkubation über 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen dreimal ausgewaschen.

Die für die nächsten Schritte benötigten Reagenzien wurden im Wasserbad auf eine Temperatur zwischen 20° C und 25° C vorgewärmt. Zunächst wurde die Puffer/Substrat-Lösung mit Chromogen-Lösung versetzt. Beim Substrat handelte es sich um Wasserstoffperoxid ($c = 0,3 \text{ g/l}$) in Citrat-Phosphat-Pufferlösung mit dem Natriumsalz der p-(ethyl-mercuri-thio)-benzolsulfonsäure als Konservierungsmittel. Als Chromogen wirkte o-Phenyldiamin-dihydrochlorid. Je 200 µl dieser Lösung wurden in die Röhrchen einpipettiert. Das Chromogen wirkt als Wasserstoffdonator, bei seiner Oxidation entstehen konjugierte Doppelbindungen, die die ursprünglich farblose Substanz in ein gelbbraunes Produkt umwandeln.

Wir führten zwei Testreihen durch, wobei die erste 30 Minuten lang (vom Hersteller empfohlene Zeit), die zweite 60 Minuten lang in einem abgedunkelten Schrankfach lichtgeschützt bei einer Temperatur zwischen 20° C und 25° C inkubiert wurden. Nach diesen Zeiten wurden die Reaktionen mit 1 ml einer 0,5 n Schwefelsäure gestoppt. Die Proben wurden unmittelbar darauf bei der Wellenlänge 492 nm gegen Wasser photometriert.

2.4. Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper

Zur Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper verwendeten wir den Phadebas-RAST (Pharmacia, Freiburg). Der Test wurde in unmodifizierter Form nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

Der Phadebas-RAST unterscheidet sich vom Phadebas-PRIST im wesentlichen dadurch, daß statt Anti-IgE-Antikörpern Antigene an die Papierscheiben gekoppelt werden. An diese Antigene können dann nur Antikörper mit einem entsprechenden Antigen-bindenden (Fab) Anteil fixiert werden. Diese Komplexe werden in den folgenden Schritten mit ^{125}J -markierten Anti-IgE-Antikörpern inkubiert, mehrmals gewaschen, um die Überzähligen radioaktiven Moleküle zu entfernen, und schließlich im Gamma-Counter gemessen.

Die Radioaktivität in den Proben wird mit der von vier Referenzseren unterschiedlicher Konzentrationen verglichen und danach in verschiedene RAST-Klassen (0 bis 4) eingeteilt.

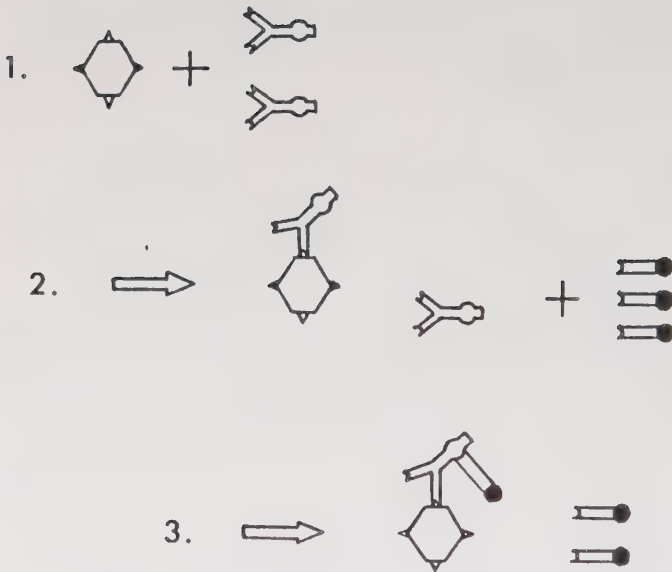


Abb. 5: Prinzip des Phadebas-RAST

1. Schritt: Inkubation von IgE mit an Papierscheiben gekoppeltem Antigen. Nur korrespondierende Antikörper werden gebunden.
2. Schritt: Auswaschen der IgE-Antikörper mit nicht passendem Fab-Teil. Inkubation von radioaktiv markierten Anti-IgE-Antikörpern.
3. Schritt: Auswaschen der nicht gebundenen, radioaktiven Antikörper. Bestimmung der Radioaktivität im Gamma-Counter.

2.5. Reagenzien

2.5.1. Mitogene

Die Mitogene wurden entweder als fertige Lösung oder als Lyophilisate von den Herstellern bezogen. Aus den gelieferten Produkten stellten wir durch Verdünnung in Hanks'scher Lösung Stammlösungen her, die bei -80°C tiefgefroren wurden.

Die Stammlösungen wurden bei Bedarf aufgetaut und aus ihnen durch weitere Verdünnung in Hanks'scher Lösung die in den Kulturen eingesetzten Mitogenlösungen gewonnen.

Die Konzentrationsangaben entsprechen den Endkonzentrationen in den Kulturansätzen.

2.5.1.1. Pokeweed Mitogen (PWM)

Wir erhielten das Mitogen als Lösung (Gibco, Cat. Nr. 670-5360). Konzentrationsangaben konnte der Hersteller nicht machen, die Mitogenlösung wurde nach ihrer biologischen Aktivität standardisiert. In unseren Zellkulturen waren die Mitogene auf 1:120 der Ausgangslösung verdünnt.

Bei PWM handelt es sich um einen Extrakt aus der Wurzel der Kermesbeere (*Phytolacca americana*), dessen mitogene Fähigkeit zuerst von Farnes et al. 1964 (37) beschrieben wurde. Der Extrakt ist ein Gemisch von Proteinen mit leukagglutinierenden, hämagglutinierenden und Lymphozyten-stimulierenden Eigenschaften. Mit chromatographischen Methoden wurden verschiedene Fraktionen gewonnen, in denen bis zu fünf mitogene Proteine gefunden

wurden. Die Molekulargewichte dieser Eiweißkörper lagen zwischen 20 000 und 30 000 D, eines war aus Untereinheiten von ca. 22 000 D zu einem Dimer zusammengesetzt, die anderen lagen als Monomere vor (8, 10, 107, 145, 146, 152).

PWM führt nach einer Zeit von 66 bis 78 Stunden zu einem maximalen Thymidineinbau. Morphologisch können nach dieser Zeit drei verschiedene Zelltypen unterschieden werden:

1. 40 bis 50 % der Zellpopulation bestehen aus typischen kleinen Lymphozyten.
2. 30 bis 35 % sind PWM-Blasten Typ I, die von den durch PHA transformierten Zellen nicht zu unterscheiden sind. Sie sind ca. 20 bis 35 μm groß, besitzen einen zentralen oder nur gering exzentrischen Kern mit hohem Euchromatin- und wenig Heterochromatingehalt und einen oder zwei Nucleoli. Ihr Zytoplasma ist basophil, es zeigt selten eine kleine perinukleäre Aufhellungszone und immer eine deutliche Vakuolisierung. Nach 24 bis 48 Stunden findet man PAS-positive, grobe Granula, die nach 72 Stunden nicht mehr nachweisbar sind.
3. 25 bis 30 % machen PWM-Blasten Typ II aus; sie sind rund oder oval mit einem maximalen Durchmesser von 25 bis 30 μm . Der Kern liegt exzentrisch, weist einen hohen Euchromatingehalt mit vermehrtem Heterochromatin auf und besitzt einen bis drei Nucleoli. Der Kern wird häufig von einer deutlichen Aufhellungszone umgeben. Zytoplasmatische Vakuolen sind selten oder fehlen. Die Zellen weisen eine intensive Basophilie auf, die PAS-Reaktion ergibt feine, diffuse Granula mit einem Reaktionsmaximum nach 72 Stunden. Diese Typ II-Zellen zeigen eine große strukturelle

Ähnlichkeit mit Plasmablasten (16, 20, 32).

Seine Wirkung entfaltet PWM nach Bindung an Membranrezeptoren, wobei die Viskosität der Zellmembran vermindert wird (152).

2.5.1.2. Phytohämagglutinin (PHA)

Das Mitogen wurde uns als steriles, wasserlösliches Lyophilisat zugesandt (Gibco, Cat. Nr. 670-0576), das wir in 10 ml Aqua bidest. auflösten. Das Trockengewicht betrug ca. 13 mg, davon nahm NaCl einen großen Anteil ein. Der Hersteller empfahl die Verwendung des Mitogens in einer Konzentration von 10 µg/ml. In unseren Kulturen betrug die PHA-Konzentration 10,8 µg/ml (10 µg/ml nach Zugabe von 20 µl ³H-Thymidinlösung zu den Zellsuspensionen).

PHA ist ein Extrakt aus *Phaseolus vulgaris*, der Gartenbohne, dessen leukagglutinierende und hämagglutinierende Eigenschaften schon um die Jahrhundertwende bekannt waren. Die Entdeckung der Mitoseinduktion von Lymphozyten durch PHA wird Nowell (96) zugeschrieben; sie erfolgte 1960. Aus dem Extrakt konnten zwei aktive Proteine näher charakterisiert werden: Das erste besteht aus acht Untereinheiten, hat ein Molekulargewicht von 138 000 D und einen Zuckeranteil von 8,9 %. Das zweite ist aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, besitzt ein Molekulargewicht zwischen 98 000 und 138 000 D und weist einen Kohlenhydratanteil von 4,1 % auf (16). Beide Proteine reagieren spezifisch mit D-Galaktosaminacetat.

Nach Zugabe von PHA zu Lymphozytensuspensionen konnten kurze Zeit nach Bindung der Proteine an membranständigen Rezeptoren - möglicherweise waren sie an D-Galaktosamin-

acetatresten beliebiger Membranproteine fixiert - frühe Ereignisse beobachtet werden: Der Umsatz der Phospholipide und der Ca^{++} -Membrantransport waren erhöht, die cAMP-Konzentration stieg an, lysosomale Enzyme erfuhren eine Umverteilung. Diese Vorgänge mündeten schließlich in einer Genaktivierung; dabei wurden Histone acetyliert, nukleäre Proteine phosphoryliert, die RNA-Synthese und auch die Proteinsynthese wurden verstärkt. Nach einem bis zwei Tagen Kultur begann die DNA-Synthese. Die Aufnahme von PHA in die Zelle war für die Auslösung dieser Vorgänge nicht von Bedeutung, da RNA- und DNA-Synthese auch nachgewiesen werden konnten, wenn PHA durch Adsorptionstechniken von den Zellen nicht in das Zytoplasma eingeschleust werden konnte (16, 24, 85).

Im wesentlichen waren nach PHA-Stimulation Lymphoblasten nachweisbar, die morphologisch den Typ I-PWM-Blasten gleichen (16). Daraus und auf Grund anderer experimenteller Untersuchungen wurde der Schluß gezogen, daß PHA vor allem mitogen auf T-Lymphozyten wirke (70, 149). Dennoch (scheint das Mitogen auch auf B-Lymphozyten eine stimulierende Wirkung auszuüben, wobei unklar ist, ob dieser Effekt indirekt durch Vermittlung von T-Zellen oder durch direkte Beeinflussung der B-Lymphozyten erreicht wird (9, 85, 100, 102). Die Transformationsrate in einer gegebenen Lymphozytenpopulation beträgt bei PHA etwa 65 bis 90 % der Zellen (16).

2.5.1.3. Concanavalin A (Con A)

Von dem sterilen, wasserlöslichen Lyophilisat (Carl Roth, Karlsruhe, Kat. Nr. 06/6464) wurden 2 mg in 10 ml Aqua bidest. aufgelöst. In den Kulturen wurde Con A in einer Konzentration von 3,3 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

Con A wird aus der Schwertbohne *Canavalia ensiformis* gewonnen. Wie bei PHA handelt es sich um ein Lektin - ein Pflanzenprotein, das imstande ist, Zellen zu agglutinieren und an spezifische Zuckerreste zu binden (127).

Con A ist das erste Mitogen, dessen Struktur beschrieben werden konnte (25). Das globuläre Protein liegt bei einem pH von 7 als Tetramer, bei einem pH < 6 dissoziiert in Dimeren vor. Es wird zusammengesetzt aus vier identischen Untereinheiten, welche je 237 Aminosäuren umfassen, je ein Ca^{++} - und ein Mg^{++} -Ion enthalten und eine Bindungsstelle für Glycosidreste besitzen, die spezifisch ist für α -D-Mannopyranosid- und α -D-Glucopyranosidreste (45, 95). Das Monomer hat keinen Kohlenhydratanteil und hat ein Molekulargewicht von 25 000 bis 27 000 D. Die Größe einer Untereinheit konnte durch kristallographische Methoden auf 40 Å x 39 Å x 42 Å bestimmt werden.

Die maximalen Stimulationsraten sind beim nativen, tetrameren Con A zu erwarten bei Konzentrationen um 5 µg/ml (25, 144). Bei höheren Konzentrationen tritt rasch ein hemmender Effekt auf die Mitoseinduktion ein. Über den Wirkungsmechanismus von Con A besteht noch keine Klarheit. Es übt - in Abhängigkeit vom experimentellen Vorgehen - antagonistische Wirkungen auf das Phänomen des " patching and capping " bei Lymphozyten aus. Dieser Begriff beschreibt die Fleckbildung von Membranrezeptoren und ihre darauf folgende Anordnung an einem Pol der Zelle nach Zugabe von Antigenen. Con A hemmt diesen Vorgang in aller Regel (25, 151), kann ihn aber auch induzieren (25). Eine Rolle bei diesen Vorgängen spielen die zytoplasmatischen, mikrotubulären Strukturen; Con A wirkt nach Bindung an Membranrezeptoren als transmembranöses Signal, welches zu einer Änderung der Verankerung von Membranproteinen durch Mikrotubuli und Mikrofilamente führt

und die Fluidität der Zellmembran beeinträchtigt.

Das Mitogen stimuliert vor allem T-Lymphozyten. Die Transformationsrate beträgt ca. 35 bis 45 % (16). Andersson et al. (3) konnten eine indirekte Beeinflussung von B-Lymphozyten durch von T-Lymphozyten freigesetzte humorale Faktoren beobachten. Auch durch die Fixation des Con A am Boden von Petrischalen wurden B-Lymphozyten zur DNA-Synthese angeregt, während T-Lymphozyten unter diesen Bedingungen nicht aktiviert wurden (4).

2.5.2. Allergene

Als Allergene wurden die Stoffe eingesetzt, die bei Patienten mit atopischem Ekzem als häufigste Aeroallergene gefunden wurden. Es handelte sich um Katzenepithel, Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*) und Gräserpollen. Wir verwendeten als Ausgangsmaterial Pricklösungen der o.g. Allergene (Bencard-Allergie-Dienst, Beecham-Wülfring, Neuss).

Die Ausgangslösungen wurden mit Hanks'scher Lösung auf die Konzentrationen 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. In die Zellkulturen wurden jeweils 20 µl dieser Allergenlösungen eingebracht, so daß wir Endkonzentrationen von 1:120, 1:1200 und 1:12 000 der Pricklösungen erhielten. Nachdem nach drei Tagen 20 µl ³H-Thymidin-Lösung in die Kulturen einpipettiert wurden, lagen die Konzentrationen danach bei 1:130, 1:1300 bzw. 1:13 000.

Bei den Allergenextrakten besteht das Problem, daß die allergenen Bestandteile im einzelnen kaum charakterisiert sind. Tatsächlich sind die Extrakte aus häufig schwer trennbaren Gemischen von allergisierenden und nichtallergisierenden Stoffen zusammengesetzt, von denen erst wenige

Einzelsubstanzen näher beschrieben werden konnten (79). Daraus ergeben sich Schwierigkeiten für die Standardisierung, die bei Beecham-Wülfing über die biologische Reaktion erfolgte. Freiwillige, bekannte Allergiker wurden im Doppelblindversuch einem Hauttest ausgesetzt, und dadurch wurde die mittlere allergisierende Potenz eines Extraktes bestimmt. Naturgemäß ist dieses Verfahren wegen der großen Variabilität der Hautreaktionen sehr ungenau. Nach dieser Testung konnten die in der Lösung enthaltenen Allergenmengen durch das Extraktionsverfahren definiert werden, indem eine bestimmte Menge Allergen aus der Trockenmasse der Pflanzen, der Tierhaare oder der Milbenkulturen durch eine bestimmte Menge Extraktionsflüssigkeit extrahiert wurde. Über ihre biologische Wirkung an Allergikern sind die Allergenlösungen demnach vergleichbar, hergestellt werden sie nach einem durch die biologische Prüfung begründeten Extraktionsverfahren.

Die Extraktionsflüssigkeit setzt sich bei den Pricklösungen zusammen aus

0,5 Phenol
6,0 NaCl
50,0 Glyzerin
H₂O ad 100,0

Unterschiedlich waren bei den drei verwendeten Pricklösungen die Extraktionsmengen der Allergene. Der Hersteller gab diese Extraktionsmengen als Relativgewichte in % w/v (w/v = weight/volume) an. % w/v bedeutet danach, daß eine bestimmte Menge Allergen von 100 ml Extraktionsflüssigkeit extrahiert wurde (Informationen der Fa. Beecham-Wülfing). 1 % w/v entsprechen 100 Noon-Einheiten pro Milliliter.

2.5.2.1. Katzenepithel

Pricklösung, Beecham-Wülfig, Nr. 3204

Konzentration: 150 % w/v $\hat{=}$ 15 000 Noon-Einheiten/ml

Die Katzenhaare und -schuppen wurden von verschiedenen, in Großbritannien vorkommenden Katzenrassen gewonnen.

2.5.2.2. Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

Pricklösung, Beecham-Wülfig, Nr. 2801

Konzentration: 1,2 % w/v $\hat{=}$ 120 Noon-Einheiten/ml

Der Extrakt wurde von Hausstaubmilben hergestellt, die in den Laboratorien von Beecham-Wülfig in England gezüchtet wurden.

In einer Reihe von Arbeiten (1, 2, 29, 52, 53) wurde eine Verbindung zwischen dem Allergen der Hausstaubmilbe und dem atopischen Ekzem gesehen. *Dermatophagoides pteronyssinus* ist fast weltweit gefunden worden, außer in Gebieten mit extremen Klimaverhältnissen, z. B. der Arktis oder der Antarktis. Sie werden in allen denkbaren Stellen angetroffen, an denen sich Hausstaub ablagert, am häufigsten und in dichtester Besiedelung in den Betten. Die potenten Allergene stammen wahrscheinlich aus dem Magen-Darm-Trakt der Milben und können im Kulturmateriail nachgewiesen werden. Die Anzahl von Lysin-Zucker-Bindungen an immunologisch aktiven Trägermolekülen bestimmt ihre allergene Potenz (141, 142).

2.5.2.3. Gräserpollen

Pricklösung, Beecham-Wülfig, Nr. 4100

Konzentration: 2,5 % w/v $\hat{=}$ 250 Noon-Einheiten/ml

Die Lösung setzt sich zusammen aus dem Extrakt von zwölf allergologisch bedeutsamen Gräserpollen, die im Pollinarium der Herstellerfirma in Großbritannien gezüchtet wurden. Im einzelnen handelt es sich um die Pollen von

- Glatthafer (*Arrhenatherum elatius*)
- Kammgras (*Cynosurus cristatus*)
- Knäuelgras (*Dactylis glomerata*)
- Lolch (Raygras) (*Lolium* spp.)
- Rispengras (*Poa* spp.)
- Ruchgras (*Anthoxanthum odoratum*)
- Schwingelgras (*Festuca pratensis*)
- gemeines Straußgras (*Agrostis tenuis*)
- Trespe (*Bromus* spp.)
- Wiesenfuchsschwanz (*Alopecurus pratensis*)
- Wiesenlieschgras (*Phleum pratense*)
- Wolliges Honiggras (*Holcus lanatus*)

2.5.3. Methyl-³H-Thymidin

Die wässrige, sterile Lösung des Tracers (Amersham-Buchler, Code-Nr. TRA 120) besitzt eine spezifische Aktivität von 5 Ci/mmol (185 GBq/mmol). Diese Lösung verdünnten wir im Verhältnis 1:30, in jede Kulturvertiefung wurden 20 µl mit Hilfe eines Dispensers einpipetiert. Die Aktivität in den Kulturen betrug nach Verdünnung 0,0025 mCi.

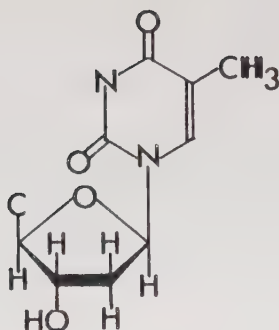


Abb. 6: Strukturformel von Methyl- ^3H -Thymidin. Die radioaktive Molekülgruppe ist doppelt kon-
turiert dargestellt.

Tritium (^3H) hat eine Halbwertszeit von 12,36 Jahren, es ist ein Betastrahler mit einer maximalen Energie $E_{\text{max.}} = 0,018 \text{ MeV}$. Die mittlere Reichweite in Wasser wird mit 0,007 mm angegeben (28).

2.5.4. Kulturmedium

2.5.4.1. Zusammensetzung des Kulturmediums

An jedem Tag, an dem ein neuer Versuchsansatz begonnen wurde, wurde das Kulturmedium aus den gelagerten Einzelbestandteilen neu hergestellt. Die Lagerung erfolgte nach den Anweisungen der Hersteller.

Das Kulturmedium wurde nach folgender Rezeptur zusammengesetzt (Einzelbestandteile s. S. 43 - 47):

MEM RPMI 1640	100 ml
Fötales Kälberserum,	10 ml
Antibiotisch-antimyko-	
tische Lösung	1 ml
MEM Nicht essentielle	
Aminosäuren	1 ml
MEM Vitamine	1 ml
L-Glutamin	1 ml
Hepes Puffer	2 ml

Bei der Isolierung der Zellen fand als Waschlösung die folgendermaßen zusammengesetzte Lösung Verwendung:

Hanks'sche Lösung	100 ml
Hepes Puffer	2 ml
MEM Nicht essentielle	
Aminosäuren	1 ml

2.5.4.2. Liste der Einzelbestandteile

2.5.4.2.1. MEM RPMI 1640

Gibco, Cat. Nr. 320-1875

	mg/l
Anorganische Salze	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	100,0
KCl	400,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	100,0
NaCl	6000,0
NaHCO_3	2000,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1512,0

	mg/l
Andere Bestandteile	
Glucose	1,0
Phenolrot	5,0
Aminosäuren	
L-Arginin	200,0
L-Asparagin	50,0
L-Asparaginsäure	20,0
L-Cystin	50,0
L-Glutaminsäure	20,0
L-Glutamin	300,0
Glycin	10,0
L-Histidin	15,0
L-Isoleucin	50,0
L-Leucin	50,0
L-Lysin-HCl	40,0
L-Methionin	15,0
L-Phenylalanin	15,0
L-Prolin	20,0
L-Serin	30,0
L-Threonin	20,0
L-Tryptophan	5,0
L-Tyrosin	20,0
L-Valin	20,0
Vitamine	
Biotin	0,20
D-Ca-Pantothenat	0,25
Cholinchlorid	3,00
Folsäure	1,00
i-Inositol	35,00
Nicotinamid	1,00
Pyridoxin HCl	1,00
Riboflavin	0,20

	mg/l
Thiamin HCl	1,00
Vitamin B ₁₂	0,005

2.5.4.2.2. MEM-Nicht essentielle Aminosäuren (100 x)

Gibco, Cat. Nr. 320-1140

L-Alanin	890,0
L-Asparagin-H ₂ O	1500,0
L-Asparaginsäure	1330,0
L-Glutaminsäure	1470,0
Glycin	750,0
L-Prolin	1150,0
L-Serin	1050,0

2.5.4.2.3. MEM-Vitamine (100 x)

Gibco, Cat. Nr. 320-1120

NaCl	8500,0
D-Ca-Pantothenat	100,0/
Cholinchlorid	100,0
Folsäure	100,0
i-Inositol	200,0
Nicotinamid	100,0
Pyridoxal-HCl	100,0
Riboflavin	10,0
Thiamin HCl	100,0

2.5.4.2.4. Antibiotisch-antimykotische Lösung (100 x)

Gibco, Cat. Nr. 600-5240

Penicillin G	10 000 IU/ml
Streptomycin	10 000 µg/ml
Amphotericin B	25 µg/ml

2.5.4.2.5. Hepes-Puffer

Gibco

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure

Summenformel: $C_8H_{18}N_2O_4S$

p_{ka} bei 20° C = 7,55

$p_{ka}/^{\circ}C = - 0,014$

2.5.4.2.6. Fötale Kälberserum

Gibco, Cat. Nr. 220-6300

2.5.4.2.7. L-Glutamin 200 mM

Gibco, Cat. Nr. 320-5030

2.5.4.2.8. Hanks'sche Lösung

Gibco, Cat. Nr. 320-1570

	mg/l
Anorganische Salze	
CaCl ₂	140,0
KCl	400,0
KH ₂ PO ₄	60,0
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	100,0

	mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	100,0
NaCl	8000,0
NaHCO_3	350,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	90,0
Andere Bestandteile	
Glucose	1000,0
Phenolrot	10,0
Aminosäuren	
L-Arginin HCl	126,0
L-Cystin	24,0
L-Glutamin	292,0
L-Histidin	42,0
L-Isoleucin	52,0
L-Lysin HCl	72,50
L-Methionin	15,0
L-Phenylalanin	32,0
L-Threonin	48,0
L-Tryptophan	10,0
L-Tyrosin	36,0
L-Valin	46,0
Vitamine	
D-Ca-Pantothenat	1,0
Cholinchlorid	1,0
Folsäure	1,0
i-Inositol	2,0
Nicotinamid	1,0
Pyridoxal HCl	1,0
Riboflavin	0,1
Thiamin HCl	1,0

2.6. Statistik

2.6.1. Statistische Tests

Um Verteilungsunterschiede zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe beim Lymphozytentransformationstest (LTT) ausfindig zu machen, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Als Parameter dienten die Indices, die nach den Formeln IV (Kap. 3.2.2.), VI (Kap. 3.2.3.1.) und VII (Kap. 3.2.3.2.) auf zwei Dezimalstellen nach dem Komma bestimmt wurden.

Beim Wilcoxon-Test handelt es sich um einen sehr einfachen Rangsummentest zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben. Er kann keine Aussagen zu Variabilitätsparametern machen, vielmehr prüft er Verteilungsunterschiede und spricht vor allem auf Unterschiede der Lageparameter an (61, S. 331), also vor allem der Mediane. Der Vorteil des Tests ist, daß er verteilungsfrei ist, d. h. daß die Einzelwerte der Prüfgrößen nicht einer bestimmten Verteilung gehorchen müssen, z. B. einer de-Moivre-Verteilung. Für den LTT stehen jedoch keine breit angelegten Untersuchungen zur Verfügung, die über die Verteilung der Ergebnisse in der Grundgesamtheit Auskunft erteilen könnten. Es ist zwar möglich, auf Grund bestimmter Voraussetzungen aus einer Stichprobe, wie unsere Untersuchung sie darstellte, auf die Verteilung in der Grundgesamtheit zu schließen. Da diese Voraussetzungen nicht bei allen unseren Bestimmungen erfüllt waren und uns Aussagen über die Lage der Mediane bzw. über Verteilungsunterschiede genügten, zogen wir diesen statistischen Test vor (61).

Ähnlich problematisch erwies sich die statistische Auswertung der IgE-Bestimmungen. Es ist zwar bekannt, daß

die Serum-IgE-Spiegel angenähert einer log-Normalverteilung folgen (89), die Verhältnisse bei in vitro Messungen dagegen sind ungewiß. Nach der Sichtung unserer Ergebnisse stellten wir fest, daß die interindividuellen Werte sehr stark, die Werte einer Versuchsperson nur mäßig streuten. Die verglichenen Einzelwerte sind nicht unabhängig voneinander, da sie aus denselben Zellpopulationen gewonnen wurden. Wir mußten uns deshalb wieder für einen sehr einfachen Test entscheiden, den Vorzeichentest. Dieser läßt ebenfalls keine Aussagen über Variabilitätsparameter zu, sondern ermöglicht nur qualitative Auskünfte. Unabhängig vom quantitativen Umfang wurden die positiven oder negativen Differenzen eines Meßwertes gegenüber einem Vergleichswert bewertet (bzw. der Quotient aus Meßwert dividiert durch den Vergleichswert).

2.7.2. Begriffe

An dieser Stelle sollen einige, in dieser Arbeit häufiger erwähnte, Begriffe der Statistik in Erinnerung gebracht werden.

Median oder Zentralwert einer Verteilung (m):

Er ist das 0,5-Quantil, also der Punkt, der eine Häufigkeitsverteilung in zwei Hälften teilt. Er ist damit der Wert, welcher nicht mehr als die Hälfte der Stichprobenwerte überschreitet, aber auch nicht von mehr als der Hälfte der Stichprobenwerte überschritten wird. Bei ungeradem Umfang einer Stichprobe ist der Median als ein Wert der Stichprobe realisiert (bei $n = 15$ ist es der 8., für den die o. g. Bedingung zutrifft), bei geradem Umfang ist er nicht realisiert (bei $n = 14$ wird er errechnet als Mittelwert zwischen dem 7. und dem 8.).

Mittelwert ($\bar{x}$):

Er errechnet sich aus der Summe der Stichprobenwerte dividiert durch ihre Anzahl.

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) : n$$

Standardabweichung (s):

Sie wurde berechnet nach der Formel

$$s = s^2 \quad \text{mit}$$
$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{x_{\cdot}^2}{n}}{n - 1}$$

Mittlerer Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$):

Die Formel zu seiner Berechnung lautet

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Variationskoeffizient (VK):

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 (\%)$$

Modus:

Der Modus bezeichnet denjenigen Wert bzw. diejenige Klasse, den eine Variable am häufigsten angenommen hat.

Spannweite:

Die Spannweite ist die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten Wert, der in einer Verteilung aufgetreten ist.

3. ERGEBNISSE

3.1. Methodische Voruntersuchungen

3.1.1. Lymphozytentransformationstest

3.1.1.1. Häufigkeitsverteilung und Summenhäufigkeit beim LTT

Aus den Triplicates jedes Ansatzes beim Lymphozytentransformationstest wurden die Variationskoeffizienten VK (Formel s. S. 50) ermittelt. Die Abbildung 7 zeigt die

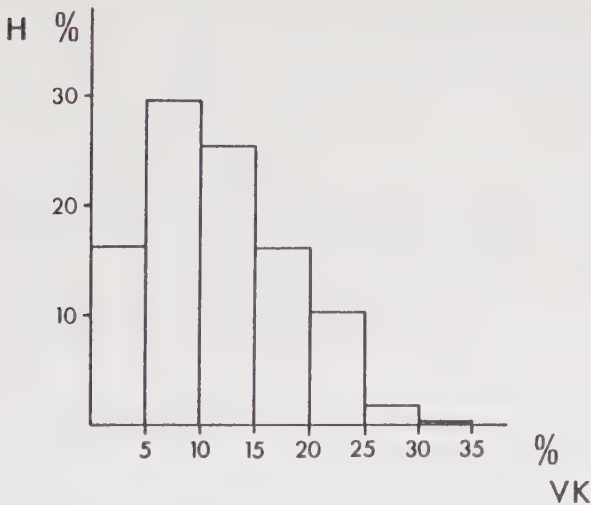


Abb. 7: Verteilung der Variationskoeffizienten beim LTT. In der Ordinate VK sind die Variationskoeffizienten in Prozent, in der Abszisse H die relativen Häufigkeiten in Prozent aufgetragen. Die ganzen Zahlen bilden die unteren Klassengrenzen.

Verteilung der Variationskoeffizienten, wobei die Klassenbreiten 5 % betrugen und die ganzen Zahlen immer die unteren Klassengrenzen bildeten.

Die Anzahl der ausgewerteten Triplicates betrug $n = 947$. Die Verteilung war linksgipflig mit einem Modus in der Klasse zwischen 5 % und 9,99 %, in der 29,8 % aller Va-

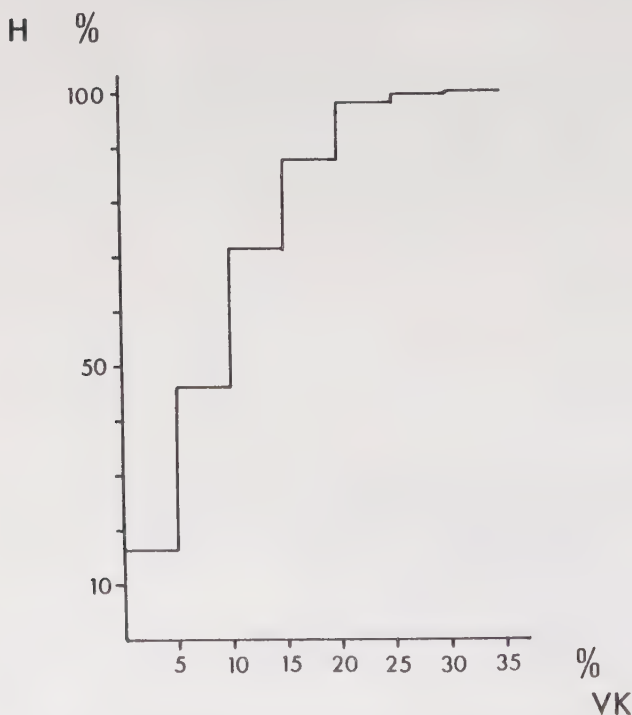


Abb. 8: Summenhäufigkeit der Variationskoeffizienten beim LTT. Die Ordinate VK zeigt die Variationskoeffizienten in Prozent, die Abszisse H die Summenhäufigkeit in Prozent. Die ganzen Zahlen bezeichnen die unteren Klassengrenzen.

relationskoeffizienten lagen.

Bei der Auswertung der Summenhäufigkeiten zeigte es sich, daß nur 2 % der Variationskoeffizienten größer waren als 25 %, während 87,8 % der Variationskoeffizienten kleiner als 20 % waren. Der Median lag in der Klasse zwischen 10 % und 14,99 %.

3.1.1.2. Versuche zur Kinetik des LTT

Es wurden jeweils drei identische Platten mit den Triplicates folgender Kulturansätze vorbereitet:

1. Leerkultur K_0
2. Kultur mit PWM K_{PWM}
3. Kultur mit PWM und Katzenepithel (Konzentration $1 = 10^{-1}$ der Ausgangslösung) $K_{PWM/K1}$
4. Kultur mit Katzenepithel (Konzentration 1) K_{K1}

Die Thymidineinbauraten (Cpm) wurden bei einer ersten Probandengruppe nach vier, nach fünf und nach sieben Tagen ($n = 5$), bei zwei anderen Probanden nach vier, nach sieben und nach acht Tagen gemessen. Es wurde nicht zwischen Atopikern und Kontrollpersonen unterschieden.

Die Werte aus K_0 wurden als spontane Thymidin-Einbauraten der Zellkulturen von den aus den mit Mitogenen stimulierten Kulturen gewonnenen Werten abgezogen.

Die Ergebnisse aus jenen Kulturen, die mit dem Allergen allein beschickt worden waren, lagen in der Größenordnung ihrer zugehörigen Leerkulturen und waren manchmal kleiner als diese. Aus diesem Grund führten wir unsere Berechnungen mit den aus den Allergenkulturen erhaltenen Rohwerten durch.

Wegen der hohen Variabilität der Werte zwischen den einzelnen Probanden wurden ihre natürlichen Logarithmen gebildet und aus diesen die Mittelwerte $\bar{x}$ und die mittleren Fehler der Mittelwerte $s_{\bar{x}}$ berechnet.

Die Ergebnisse sind graphisch in den folgenden Abbildungen dargestellt.

3.1.1.2.1. Kinetik mit Pokeweed Mitogen (PWM)

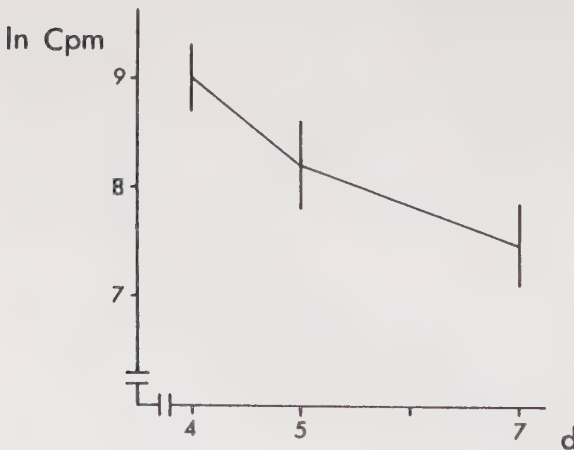


Abb. 9: Thymidineinbau ($\ln \text{Cpm}$) der Zellkulturen von 5 Probanden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) bei Stimulation mit PWM nach 4, 5 und 7 Tagen

Bei der Stimulation mit PWM war vom 4. bis zum 7. Tag hin ein deutlicher Abfall der Meßwerte zu verzeichnen, der sich im gleichen Maße auch bei einzelnen Probanden zeigte.

Bei den zwei Probanden, deren Kulturen über 4, 7 und 8 Tage geführt wurden, verlief die Kurve bis zum 7. Tag in

vergleichbarer Weise, um dann am 8. Tag wieder anzusteigen. Die nächste Abbildung zeigt dieses Verhalten.

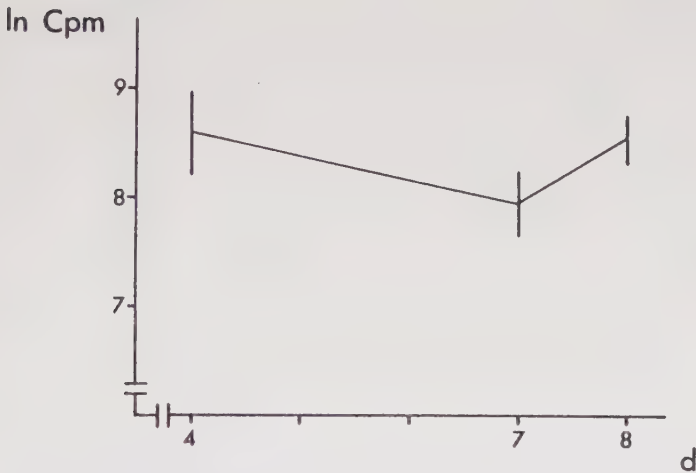


Abb. 10: Thymidineinbau (ln Cpm) der Zellkulturen von 2 Probanden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) bei Stimulation mit PWM nach 4, 7 und 8 Tagen.

3.1.1.2.2. Kinetik des LTT nach kombinierter Stimulation mit Pokeweed Mitogen (PWM) und Katzenepithel (K) (Konzentration 1)

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Messungen bei Inkubation der Zellkulturen mit PWM als Mitogen und Katzenepithel als Allergen.

Die Kurven dieser Versuchsansätze wiesen eine der PWM-Kinetik sehr ähnliche Charakteristik auf. Dem Maximum am 4. Tag folgte ein stetiger Abfall bis hin zum 7. Tag um etwa ein bis zwei logarithmische Einheiten (also auf etwa 1/2 bis 1/4 des Maximalwertes). Am 8 Tag stiegen

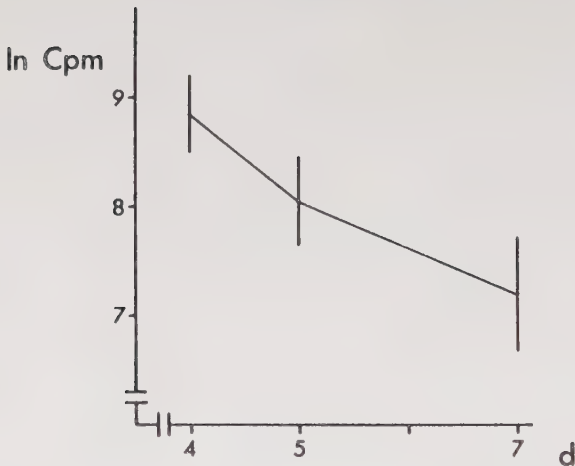


Abb. 11: Thymidineinbau (ln Cpm) der Zellkulturen von 5 Probanden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) bei kombinierter Stimulation mit PWM und Katzenepithel (Konzentration 1) nach 4, 5 und 7 Tagen.

die Meßwerte wieder an und konnten durchaus die Größe der Werte am 4. Tage wieder erreichen.

Die Kurven des PWM/K1-Ansatzes verliefen auf einem etwas niedrigeren Niveau als die des PWM-Ansatzes. Wegen des nur geringen Stichprobenumfanges wurde auf eine Prüfung auf statistische Unterschiede verzichtet. Es kam uns ja bei diesen Versuchen auch allein um den Einfluß der Zeit auf die Meßwerte beim LIT an, so daß diese Frage hier nicht von Interesse war.

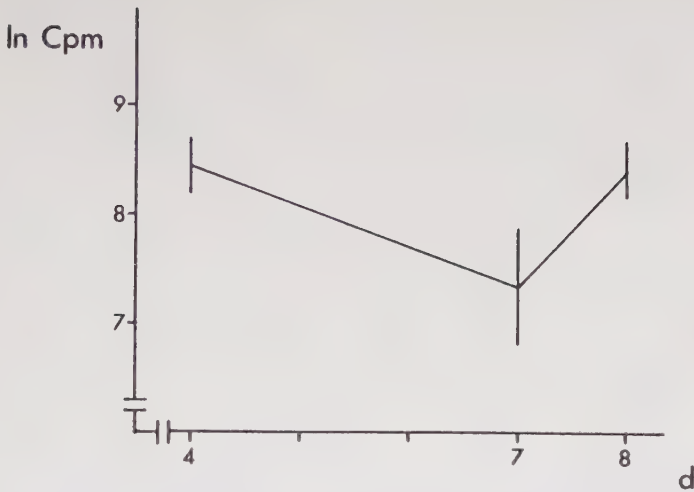


Abb. 12: Thymidineinbau (ln Cpm) der Zellkulturen von 2 Probanden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) bei kombinierter Stimulation mit PWM und Katzenepithel (Konzentration 1) nach 4, 7 und 8 Tagen.

3.1.1.2.3. Kinetik des LIT nach Stimulation mit Katzenepithel (Konzentration 1)

In diesen Versuchen gingen die Rohdaten in unsere Berechnungen ein und wurden nicht auf K_0 bezogen (bzw. K_0 wurde nicht von den Meßwerten subtrahiert), da beide Werte ungefähr in den gleichen Größenordnungen lagen und damit kaum echte Stimulationen zu erfassen waren.

Anders als in den vorher beschriebenen Versuchsanordnungen konnten in diesen Kulturen keine erheblichen Unterschiede der Meßwerte nach den verschiedenen Inkubations-

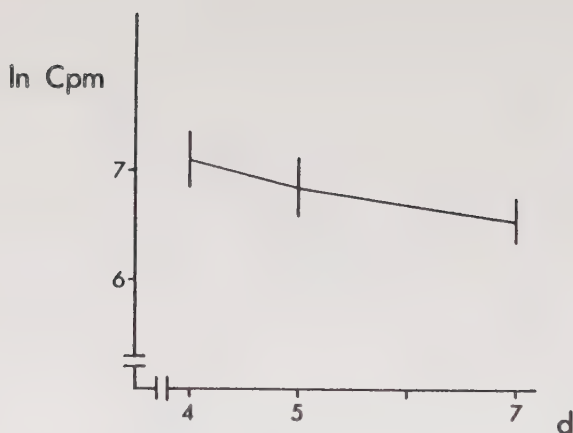


Abb. 13: Thymidineinbau (ln Cpm) der Zellkulturen von 5 Probanden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) bei Stimulation mit Katzenepithel (Konzentration 1) nach 4, 5 und 7 Tagen.

zeiten verzeichnet werden. Wenn auch in der Abbildung 13 die Kurve leicht abfällt, so ist doch der Abfall nicht steil, und die Werte bewegen sich alle in der Größenordnung um 2^7 . Die Abbildung 14 läßt schon gar keinen Unterschied mehr zwischen den Ergebnissen nach 4, 7 und 8 Tagen erkennen (allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß es sich hierbei um die Werte von nur 2 Probanden handelt). Es konnten also bei der Inkubation der Zellen mit Katzenepithel keine wesentlichen Unterschiede nach verschiedenen langen Kultivierungszeiten beobachtet werden. Ähnlich verhielten sich die Meßwerte der Leerkulturen K_0 , so daß keine echte Stimulation durch das Allergen hervorgerufen werden konnte. Wiederum muß jedoch berücksich-

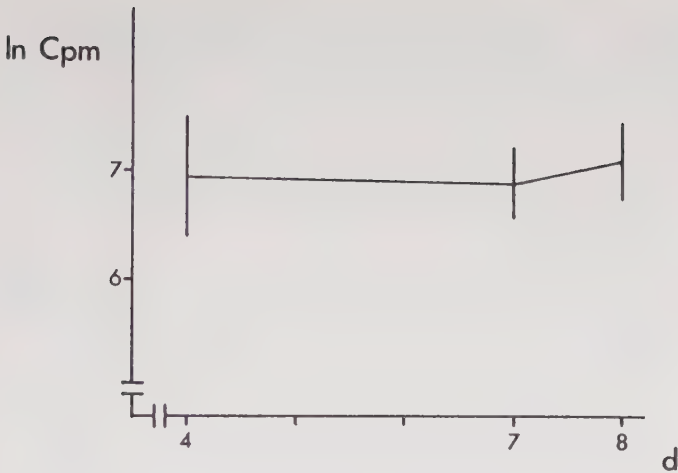


Abb. 14: Thymidineinbau ($\ln \text{Cpm}$) der Zellkulturen von 2 Probanden ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) bei Stimulation mit Katzenepithel (Konzentration 1) nach 4, 7 und 8 Tagen.

tigt werden, daß der Stichprobenumfang sehr klein war und außerdem kein Unterschied zwischen Atopikern und Kontrollpersonen gemacht wurde.

Zusammenfassend läßt sich über die Experimente zur Kinetik des LTT sagen, daß die Meßwerte vom 4. bis zum 7. Tag stark abfielen, wenn Mitogene (PWM) in die Kulturen eingesetzt waren, daß sie sich aber nur unerheblich änderten, wenn Allergene zugeführt oder wenn keine Stimulanzien verwendet wurden.

3.1.2. Quantitative Bestimmung der IgE-Antikörper

3.1.2.1. Güte des Radioimmunoassay (RIA)

Die zu erwartenden Konzentrationen der Kulturüberstände lagen im Bereich unter 20 U/ml, also im unteren Meßbereich des Phadebas-PRIST.

Für die Erstellung einer Eichkurve benützten wir Standards mit den IgE-Konzentrationen 20 U/ml, 7,5 U/ml, 2,5 U/ml, 1 U/ml, 0,5 U/ml und 0 U/ml (IgE-freier Verdünner).

Bei der Auswertung mehrerer Eichkurven zeigte es sich, daß bei Einsatz der Standards von 0 U/ml bis 7,5 U/ml eine lineare Beziehung zwischen Zählrate des Gamma-Counters und der IgE-Konzentration angenommen werden kann. Der 20 U/ml-Standard war nicht mehr brauchbar, da er die Linearität der Beziehung und die Steigung der Geraden in starkem Maße negativ beeinflusste. Bei Meßwerten, die größer waren als 7,5 U/ml, mußten daher die Proben entsprechend weiter verdünnt werden, um von unserer geraden Eichkurve wieder erfaßt zu werden.

Von jedem Standard wurden zwei Ansätze hergestellt, die im Counter je zweimal gezählt wurden. Für jede IgE-Konzentration des Standards (Abszisse) wurden demnach vier Zählwerte eingesetzt (Ordinate) und hieraus eine Geradengleichung errechnet. Die Korrelationskoeffizienten als Maß für den linearen Zusammenhang waren bei allen unseren Bestimmungen nach diesem Vorgehen größer als 0,98, bei der Mehrzahl der Messungen sogar größer als 0,99; auf Grund dieser Ergebnisse berechneten wir die IgE-Konzentration unserer Proben an Hand der linearen Beziehung zwischen IgE-Konzentration und Zählraten.

In einem weiteren Schritt wurde versucht, die Empfindlichkeit des Testes, also seine Fähigkeit, sehr kleine Werte zu erfassen, durch die Berechnung zweier Geraden weiter zu erhöhen. An Hand der folgenden Skizze soll dies erläutert werden.

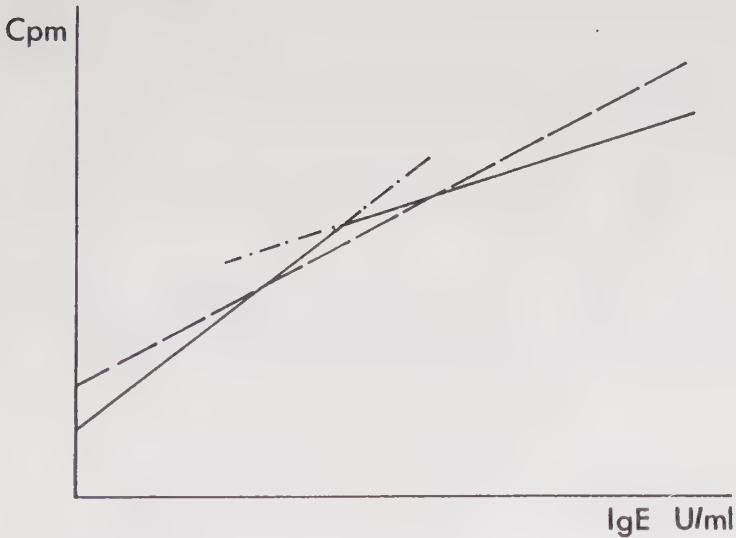


Abb. 15: Skizze zur Bestimmung der Eichkurven im PRIST für kleine IgE-Konzentrationen. Erläuterung s. Text.

Für den Fall, daß man für alle Standards nur eine Kurve berechnete, ergab sich die gestrichelte Gerade. Legten wir diese Kurve als Berechnungsgrundlage an bekannte Werte an, wurden sehr kleine Werte ($x < 0,5$ U/ml) zu niedrig oder nicht mehr erfaßt. Hohe Werte ($x > 5$ U/ml)

wurden ebenfalls zu niedrig bestimmt. Wir gingen deshalb in der Folge so vor, zwei Geraden zu berechnen. Die erste wurde aus den Standards 0 U/ml bis 1 U/ml, die zweite aus den Standards 1 U/ml bis 7,5 U/ml bestimmt. Der Schnittpunkt der beiden Geraden bildete dann die Grenze für die Berechnung der Meßwerte, unterhalb dessen die Geradengleichung der ersten, oberhalb dessen die Geradengleichung der zweiten Kurve in Kraft trat. Die durchgezogene, abgeknickte Linie der Skizze zeigt den endgültigen Verlauf der Eichkurve. Man kann leicht aus ihr ableiten, daß die sehr kleinen Werte von ihr eher erfaßt wurden als von der unterbrochenen Linie, während bei hohen Zählraten eher kleinere IgE-Konzentrationen bestimmt wurden.

Sämtliche Berechnungen wurden mit dem programmierbaren Taschenrechner TI-58 (Texas Instruments) durchgeführt, für die eigene Programme erarbeitet wurden.

Um Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Phadebas-PRIST beurteilen zu können, führten wir Bestimmungen von bekannten IgE-Konzentrationen durch. Wir verdünnten das IgE-Referenzserum des National Institute of Health (USA) und den 1000 U/ml-IgE-Standard des Enzygnost-Testes (Behringwerke AG, Marburg) zu folgenden IgE-Konzentrationen:

- | | |
|-------------|--------------|
| 1. 0,1 U/ml | 2. 0,25 U/ml |
| 3. 0,5 U/ml | 4. 1,0 U/ml |
| 5. 1,5 U/ml | 6. 2,5 U/ml |
| 7. 4,0 U/ml | |

Im Abstand von drei Monaten wurden dieselben Proben zweimal gemessen (nach der ersten Bestimmung wurden die Proben bei - 80° C tiefgefroren).

Jede Probe (einer bestimmten Konzentration) wurde bei beiden Messungen in vier Ansätzen inkubiert.

Wir erhielten folgende Ergebnisse:

1. Messung

Meß- werte (U/ml)	Erwartungswerte E_{ij} (U/ml)						
	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5	2,5	4,0
1	0,09	0,18	0,46	0,97	1,41	2,28	4,10
2	0,05	0,20	0,52	1,01	1,35	2,24	3,46
3	0,14	0,21	0,46	0,97	1,46	2,24	3,88
4	0,15	0,23	0,50	0,90	1,38	2,05	3,66
M_{ij}	0,11	0,21	0,49	0,96	1,40	2,22	3,78
s_{ij}	0,05	0,02	0,03	0,05	0,05	0,11	0,28
s_{xij}	0,03	0,01	0,02	0,03	0,03	0,06	0,14

Tab. 3: Meßwerte der ersten Bestimmung bekannter IgE-Konzentrationen im modifizierten PRIST

Vergleich und Auswertung der beiden Bestimmungen:

Für beide Messungen wurden die Beträge der Differenzen (D_{ij}) aus Erwartungswerten (E_{ij}) minus Mittelwerte der gemessenen Werte (M_{ij}) berechnet nach der Formel

$$1) D_{ij} = E_{ij} - M_{ij}, \quad i = \text{Anzahl der Messungen} \\ (1, 2)$$

$$j = \text{Anzahl der Lösungen mit} \\ \text{verschiedenen IgE-Kon-} \\ \text{zentrationen} \\ (1, \dots, 7)$$

Daraus errechneten wir die prozentualen Abweichungen (A_{ij}) der gemessenen Werte von den Erwartungswerten nach

2. Messung

Meß- werte U/ml)	Erwartungswerte E_{2j} (U/ml)						
	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5	2,5	4,0
1	0,08	0,22	0,51	0,86	1,27	1,85	4,24
2	0,07	0,26	0,46	0,85	1,21	1,85	4,16
3	0,08	0,26	0,47	0,89	1,25	1,95	4,24
4	0,05	0,21	0,42	0,88	1,25	1,95	4,24
M_{2j}	0,07	0,24	0,47	0,87	1,24	1,89	4,17
s_{2j}	0,01	0,03	0,04	0,02	0,03	0,05	0,10
s_{x2j}	0,004	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03	0,05

Tab. 4: Meßwerte der zweiten Bestimmung bekannter IgE-Konzentrationen im modifizierten PRIST, drei Monate nach der ersten Messung

$$II) \quad A_{ij} = \frac{D_{ij}}{E_{ij}} \cdot 100 (\%)$$

Die folgende Tabelle 5 zeigt diese Werte aufgelistet.

Die intra-Test-Übereinstimmung der Werte halten wir bei diesen Bestimmungen für sehr gut. Die Standardabweichungen waren mit Ausnahme der niedrigen Konzentrationen ($x = 0,1$ U/ml) klein und lagen in den meisten Fällen unter 10 % der zugehörigen Mittelwerte. Bei den größeren Werten wurden die Variationskoeffizienten kleiner und waren manchmal niedriger als 5 %.

Bei fast allen Bestimmungen wurden die Erwartungswerte von den Meßwerten nicht erreicht, diese lagen mit zwei Ausnahmen niedriger als wir sie nach unseren Verdünnungen berechnet hatten. Bei der zweiten Messung wichen die

	E_{ij}	M_{1j}	M_{2j}	D_{1j}	D_{2j}	A_{1j}	A_{2j}
1	0,1	0,11	0,07	0,01	0,03	10	30
2	0,25	0,21	0,24	0,04	0,01	16	4
3	0,5	0,49	0,47	0,01	0,03	2	6
4	1,0	0,96	0,87	0,04	0,13	4	13
5	1,5	1,40	1,24	0,10	0,26	7	17
6	2,5	2,22	1,89	0,28	0,61	11	24
7	4,0	3,78	4,17	0,22	0,17	6	4

Tab. 5: Vergleichsdaten bei der Bestimmung bekannter IgE-Konzentrationen in zwei Messungen zu verschiedenen Zeiten.

i = Anzahl der Messungen (1, 2)

j = Anzahl der Lösungen mit verschiedenen IgE-Konzentrationen (1, ..., 7)

E_{ij} = Erwartungswerte, erwartete IgE-Konzentrationen

M_{ij} = Mittelwerte der gemessenen Werte

D_{ij} = Beträge der Differenzen aus Erwartungswerten E_{ij} minus Mittelwerte M_{ij}

A_{ij} = prozentuale Abweichungen der Mittelwerte M_{ij} von den Erwartungswerten E_{ij}

Meßwerte dabei erheblich mehr von den Erwartungswerten ab als bei der ersten Messung.

3.1.2.2. Güte des Enzymimmunoassay (EIA)

Zusammen mit der ersten Messung im RIA führten wir gleichzeitig zwei Untersuchungen mit denselben Proben im EIA unter verschiedenen Bedingungen durch. Wie im Methodik-Teil ausgeführt, sind bei diesem enzymatischen Test drei

Inkubationsperioden notwendig. Die beiden ersten Inkubationsschritte dauerten jeweils 24 Stunden bei beiden Versuchen, im dritten Schritt unterschieden sich die beiden Ansätze dadurch, daß die enzymatische Reaktion beim ersten Mal nach 30 Minuten (Empfehlung des Herstellers), beim zweiten Mal erst nach 60 Minuten abgestoppt wurde.

Jede Probe wurde in drei Ansätzen gemessen, die Standardkurve wurde aus den Mittelwerten von je zwei Ansätzen der einzelnen Standards ermittelt.

Die Tabellen 6 bis 8 zeigen die Ergebnisse aus diesen Versuchen.

1. Messung

Meß- werte (U/ml)	Erwartungswerte E_{1j} (U/ml)						
	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5	2,5	4,0
1	0,0	0,1	0,22	0,80	0,91	2,02	4,11
2	0,0	0,1	0,33	0,74	1,26	1,85	3,70
3	0,0	0,1	0,33	0,57	1,26	2,14	3,93
M_{1j}	0,0	0,1	0,29	0,70	1,14	2,0	3,91
s_{1j}	0,0	0,0	0,06	0,12	0,20	0,15	0,21
s_{M1j}	0,0	0,0	0,03	0,07	0,12	0,09	0,12

Tab. 6: Bestimmung bekannter IgE-Konzentrationen im EIA.
Dauer des dritten Inkubationsschrittes 30 Minuten.

M_{1j} = Mittelwert der Meßwerte
 s_{1j} = zugehörige Standardabweichungen
 s_{M1j} = mittlere Fehler der Mittelwerte

2. Messung

Meß- werte (U/ml)	Erwartungswerte E_{2j} (U/ml)						
	0,1	0,25	0,50	1,0	1,5	2,5	4,0
1	0,16	0,30	0,40	0,90	1,20	2,20	4,30
2	0,21	0,26	0,40	0,95	1,30	2,20	4,90
3	0,21	0,30	0,45	0,75	1,40	2,05	4,10
M_{2j}	0,19	0,29	0,42	0,87	1,30	2,15	4,43
s_{2j}	0,03	0,02	0,03	0,10	0,06	0,09	0,14
s_{M2j}	0,02	0,01	0,02	0,06	0,03	0,06	0,08

Tab. 7: Bestimmung bekannter IgE-Konzentrationen im EIA.
Dauer des dritten Inkubationsschrittes 60 Minuten.

M_{2j} = Mittelwerte der Meßwerte

s_{2j} = zugehörige Standardabweichungen

s_{M2j} = mittlere Fehler der Mittelwerte

In gleicher Weise wie bei der Prüfung des RIA wurden auch diese Versuche in einer Tabelle (Tab. 8) auf ihre Genauigkeit hin ausgewertet.

Die Zahlen wiesen aus, daß wir beim zweiten Versuchsansatz, bei dem die enzymatische Reaktion 60 Minuten lang dauerte, bessere Ergebnisse erzielten. Beim ersten Ansatz wichen die Meßwerte zum Teil erheblich nach unten von den Erwartungswerten ab und erfaßten nur den größten Wert ($E_{17} = 4$ U/ml) sehr genau. Im zweiten Ansatz konnte gegenüber dem ersten in allen Fällen ein Anstieg der Meßwerte verzeichnet werden, wobei die IgE-Konzentrationen 0,1 U/ml, 0,25 U/ml und 4 U/ml zu hoch und die übrigen immer noch zu niedrig gemessen wurden.

j	E_{ij}	M_{1j}	M_{2j}	D_{1j}	D_{2j}	A_{1j}	A_{2j}
1	0,1	0,0	0,19	0,10	0,09	100	90
2	0,25	0,10	0,29	0,15	0,04	60	16
3	0,50	0,29	0,42	0,21	0,08	42	16
4	1,00	0,70	0,87	0,30	0,13	30	13
5	1,50	1,14	1,30	0,36	0,20	24	13
6	2,50	2,00	2,15	0,50	0,15	20	6
7	4,00	3,91	4,43	0,09	0,43	2	11

Tab. 8: Daten zur Genauigkeit des EIA bei zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen

i = Anzahl der unterschiedlichen Versuchsansätze (1, 2)

j = Anzahl der Lösungen mit unterschiedlichen IgE-Konzentrationen (1, ..., 7)

E_{ij} = Erwartungswerte, bekannte Konzentrationen der IgE-Lösungen

M_{ij} = Mittelwerte der gemessenen Werte

D_{ij} = Beträge der Differenzen aus Erwartungswerten E_{ij} minus Mittelwerte M_{ij}

A_{ij} = prozentuale Abweichungen der Mittelwerte M_{ij} von den Erwartungswerten E_{ij}

3.1.2.3. Variation der Inkubationszeiten beim RIA

Dieselben Proben wurden in drei verschiedenen Ansätzen des PRIST gemessen. Es wurden die Inkubationszeiten des ersten Reaktionsschrittes, in dem die in der Lösung enthaltenen IgE-Antikörper an die Anti-IgE-Antikörper der Papierscheiben binden, variiert. Im ersten Ansatz dauerte die Bindungszeit drei Stunden, im zweiten 24 Stunden und im dritten sieben Tage; die beiden ersten Meßreihen wurden bei Raumtemperatur, die letzte bei einer Tempera-

n	I	II	III	n	I	II	III
1	1,06	1,06	0,96	21	1,93	1,82	1,55
2	1,20	1,11	1,10	22	1,79	1,76	2,31
3	1,01	1,07	0,84	23	0,20	0,39	0,00
4	1,04	1,06	0,91	24	0,30	0,12	0,00
5	1,04	1,19	1,10	25	0,11	0,13	0,00
6	0,11	0,00	0,00	26	0,23	0,10	0,00
7	0,12	0,10	0,00	27	2,80	2,35	2,97
8	0,25	0,00	0,00	28	1,92	1,81	1,75
9	0,14	0,03	0,00	29	1,79	1,62	1,85
10	2,34	1,95	2,33	30	0,18	0,13	0,00
11	1,81	1,67	1,82	31	0,23	0,18	0,00
12	1,72	1,68	2,21	32	0,37	0,14	0,00
13	2,12	1,83	1,76	33	0,32	0,17	0,00
14	1,61	1,61	1,79	34	0,29	0,11	0,00
15	0,18	0,25	0,00	35	1,32	1,19	0,90
16	0,10	0,28	0,00	36	0,37	0,14	0,00
17	0,10	0,15	0,00	37	1,18	0,95	0,97
18	0,09	0,12	0,00	38	0,00	0,07	0,00
19	2,31	2,32	2,70	39	1,87	1,84	2,04
20	2,05	1,85	2,17	Σ	37,60	34,35	33,84

Tab. 9: Vergleich von PRIST-Meßwerten derselben Proben bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.

Spalte I : Inkubationszeiten $t_{11} = 3 \text{ h}$, $t_{12} = 24 \text{ h}$, Temperatur $T_1 = 37^\circ \text{ C}$;

Spalte II : $t_{21} = 24 \text{ h}$, $t_{22} = 24 \text{ h}$, $T_2 = 20^\circ \text{ C}$;

Spalte III: $t_{31} = 7 \text{ d}$, $t_{32} = 24 \text{ h}$, $T_3 = 4^\circ \text{ C}$;
IgE-Konzentration in U/ml.

tur von 4° C inkubiert. Die Zeiten des zweiten Inkubationsschrittes betrugen bei allen drei Ansätzen konstant 24 Stunden bei Raumtemperatur.

Die Ergebnisse erscheinen in der Tabelle 9. Wir beurteilten die Korrelationskoeffizienten der Eichkurven bei den verschiedenen Ansätzen sowie die Größe der von ihnen gemessenen Proben. Da bei der großen Variabilität der Einzelwerte innerhalb der Spalten die Standardabweichungen gegenüber den Mittelwerten relativ große Werte angenommen hätten, verwendeten wir an Stelle der Variabilitätsparameter die Summen der Spalten als Prüfgrößen.

Die höchsten Werte wurden offenbar vom ersten Ansatz geliefert, während der dritte am schlechtesten abschnitt. Im Gegensatz zu den zweiten und dritten Meßreihen wurden die Proben der ersten jedoch vor der Messung nicht eingefroren, so daß diese Maßnahme möglicherweise die Ergebnisse der beiden letzten beeinträchtigte.

Als Korrelationskoeffizienten der drei RIA-Ansätze wurden folgende Werte berechnet:

1. Ansatz (3 h) : $r = 0,9885$
2. Ansatz (24 h) : $r = 0,9993$
3. Ansatz (7 d) : $r = 0,9740$

Den deutlich besten Wert ergab der zweite Ansatz. Wir entschieden uns deshalb wegen dieser Ergebnisse für die Ausführung unserer Tests unter den Bedingungen des zweiten Ansatzes. Auch unter arbeitstechnischen Gesichtspunkten bot der 24 h-Ansatz gegenüber den beiden anderen möglichen die meisten Vorteile.

3.1.2.4. Inkubation von Mitogenen mit IgE

Um die Möglichkeit von Interaktionen zwischen Mitogenen und IgE auszuschließen, die die IgE-Messung beeinflussen könnten, inkubierten wir Lösungen mit bekannten IgE-Konzentrationen zusammen mit den von uns verwendeten Mitogenlösungen (PWM, PHA und Con A). Gleichzeitig nutzten wir diese Bestimmungen noch einmal, die Genauigkeit und Zuverlässigkeit unseres RIA zu überprüfen.

Der IgE-Standard des PRIST von 100 U/ml wurde so verdünnt, daß wir theoretische Werte (Erwartungswerte E) $E_1 = \text{ca. } 5 \text{ U/ml}$ und $E_2 = \text{ca. } 2,5 \text{ U/ml}$ erwarten durften. Die Lösungen wurden bei 37° C im Heraeus-Brutschrank inkubiert. Nach drei, fünf und sieben Tagen Inkubation wurden Proben entnommen und ihr IgE-Gehalt in jeweils drei Ansätzen gemessen. Aus den Meßwerten wurden Mittelwerte $\bar{x}$, Standardabweichungen s , mittlere Fehler der Mittelwerte $s_{\bar{x}}$ und Variationskoeffizienten VK errechnet (Formeln s. S. 50).

Die Tabellen 10 bis 13 zeigen die Ergebnisse für Kulturmedium und die Mitogene PWM, PHA und Con A in Kulturmedium (Zusammensetzung des Kulturmediums s. S. 43).

Die Mittelwerte $\bar{x}$ der verschiedenen Ansätze nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten wichen nur in geringem Umfange voneinander ab. Die Variationskoeffizienten lagen bei sämtlichen Ansätzen unter 10 %, in mehr als der Hälfte der Fälle unter 5 %.

Die Erwartungswerte wurden von den Meßwerten übertroffen; dies zeigte sich jedoch bei allen Ansätzen, auch bei dem, in dem das Kulturmedium alleine eingesetzt war. Wir folgerten aus diesem Ergebnis, daß die Mitogene die IgE-Bestimmung nicht beeinflußten, möglicherweise waren aber

	3 Tage		5 Tage		7 Tage	
	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂
1	5,76	3,38	5,36	3,17	5,18	2,76
2	5,67	3,02	5,71	3,15	5,11	2,87
3	5,85	3,37	5,66	3,34	4,92	3,18
$\bar{x}$	5,76	3,26	5,58	3,22	5,07	2,94
s	0,09	0,21	0,19	0,10	0,13	0,22
$s_{\bar{x}}$	0,05	0,12	0,11	0,06	0,08	0,13
VK (%)	1,6	6,4	3,4	3,1	2,6	7,5

Tab. 10: Meßwerte von IgE-Standards nach Inkubation mit Kulturmedium über 3, 5 und 7 Tage (je drei Ansätze derselben Proben). IgE in U/ml.

Erwartungswerte E₁: 5 U/ml

E₂: 2,5 U/ml

	3 Tage		5 Tage		7 Tage	
	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂
1	5,10	3,02	5,45	3,08	5,16	2,89
2	5,85	3,30	5,92	3,23	5,65	2,90
3	5,53	3,33	5,87	3,25	5,41	2,84
$\bar{x}$	5,49	3,22	5,57	3,19	5,41	2,88
s	0,38	0,17	0,26	0,09	0,25	0,03
$s_{\bar{x}}$	0,22	0,10	0,15	0,05	0,14	0,02
VK (%)	6,8	5,3	4,5	2,9	4,5	1,1

Tab. 11: Meßwerte von IgE-Standards nach Inkubation mit PWM in Kulturmedium über 3, 5 und 7 Tage (je drei Ansätze derselben Proben). IgE in U/ml.

Erwartungswerte E₁: 5 U/ml

E₂: 2,5 U/ml

	3 Tage		5 Tage		7 Tage	
	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂
1	5,75	2,94	5,50	3,22	5,41	3,08
2	5,65	3,47	5,88	3,24	5,42	3,27
3	5,80	3,54	5,73	3,34	5,70	-
$\bar{x}$	5,73	3,29	5,70	3,27	5,51	3,18
s	0,08	0,30	0,19	0,06	0,16	0,13
$s_{\bar{x}}$	0,04	0,17	0,11	0,04	0,10	0,10
VK (%)	1,3	9,1	3,4	1,9	3,0	4,2

Tab. 12: Meßwerte von IgE-Standards nach Inkubation mit PHA in Kulturmedium über 3, 5 und 7 Tage (je drei Ansätze derselben Proben). IgE in U/ml.
 Erwartungswerte E₁: 5 U/ml
 E₂: 2,5 U/ml

	3 Tage		5 Tage		7 Tage	
	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂
1	5,63	3,42	5,41	3,13	5,51	-
2	5,98	3,48	5,01	3,41	5,22	3,03
3	-	3,53	5,79	3,48	5,56	3,14
$\bar{x}$	5,51	3,48	5,40	3,34	5,46	3,09
s	0,18	0,06	0,39	0,19	0,22	0,08
$s_{\bar{x}}$	0,13	0,03	0,23	0,11	0,13	0,06
VK (%)	3,2	1,6	7,2	5,5	4,1	2,5

Tab. 13: Meßwerte von IgE-Standards nach Inkubation mit Con A in Kulturmedium über 3, 5 und 7 Tage (je drei Ansätze derselben Proben). IgE in U/ml.
 Erwartungswerte E₁: 5 U/ml
 E₂: 2,5 U/ml

Bestandteile des Kulturmediums für eine Kreuzreaktion verantwortlich. Gegen diese Vermutung spricht, daß in einer Reihe von Zellkulturen kein IgE nachgewiesen werden konnte. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind daher für die erhöhten Meßwerte Ungenauigkeiten beim Verdünnungsvorgang als Ursache anzusehen.

Vom fünften zum siebten Tag schien eine Tendenz zur stärkeren Abnahme der IgE-Konzentrationen in den Ansätzen vorhanden zu sein.

3.1.2.5. Kinetik der in vitro IgE-Spiegel

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die beide jeweils vier Probanden umfaßten. Von den Zellen der Probanden wurden je drei Kulturplatten mit den gleichen Ansätzen angelegt, die nach unterschiedlichen Bebrütungszeiten gestoppt und ausgewertet wurden.

Zwischen Atopikern und Kontrollpersonen wurde bei diesen Versuchen wegen des nur geringen Umfanges der Stichprobe nicht unterschieden. Wir wollten nur einen Einblick darüber erhalten, ob die IgE-Konzentrationen sich mit der Zeit verändern und nicht ihre Abhängigkeit von den Spendern prüfen.

Wegen der hohen Variabilität der Meßwerte, die die Standardabweichungen in ihrer Größe den Mittelwerten nahekomen ließen, wurden die Summen der IgE-Werte aus den einzelnen Kulturen zur Auswertung herangezogen. Die Darstellung von Variabilitätsparametern hätte die Unterschiede weniger deutlich werden lassen, da die erheblich streuenden Werte der einzelnen Versuchspersonen die zeitlichen Differenzen nivelliert hätten.

In unserer ersten Versuchsreihe legten wir Kulturen mit dem Mitogen PHA und dem Allergen Katzenepithel (K) an sowie eine Leerkultur. Das Allergen wurde in der Konzentration A1 (Verdünnung 1:10 der Stammlösung) eingesetzt. Es wurden also im einzelnen die Kulturen K_0 , K_{PHA} , $K_{PHA/K1}$ und K_{K1} hergestellt. Die Kultivierungszeiten dauerten vier, sechs und sieben Tage.

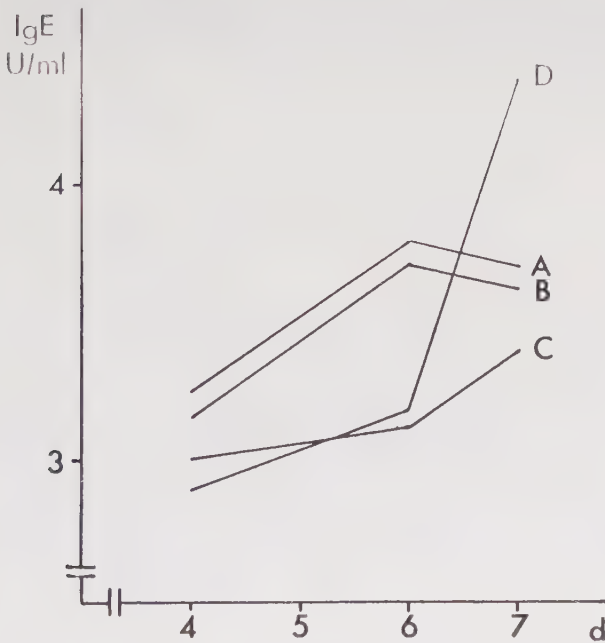


Abb. 16: Summen der IgE-Werte aus den Überständen der Zellkulturen K_0 (A), K_{PHA} (B), $K_{PHA/K1}$ (C) und K_{K1} (D) von vier Probanden nach 4, 6 und 7 Tagen Inkubation.

In zwei der vier Kulturansätze lagen die IgE-Werte nach dem siebten Inkubationstag am höchsten, in den zwei an-

deren nach dem sechsten. Bei Auswertung nach dem vierten Tag konnten noch keine großen Unterschiede der IgE-Konzentrationen in den verschiedenen Kulturansätzen festgestellt werden, und sie lagen sämtlich niedriger als nach sechs bzw. sieben Tagen.

In der zweiten Versuchsreihe wurde PWM als Mitogen verwendet. Dabei wurden die Kulturansätze K_0 , K_{PWM} , $K_{PWM/K1}$ und K_{K1} vier, fünf und sieben Tage lang im CO_2 -Schränk bebrütet.

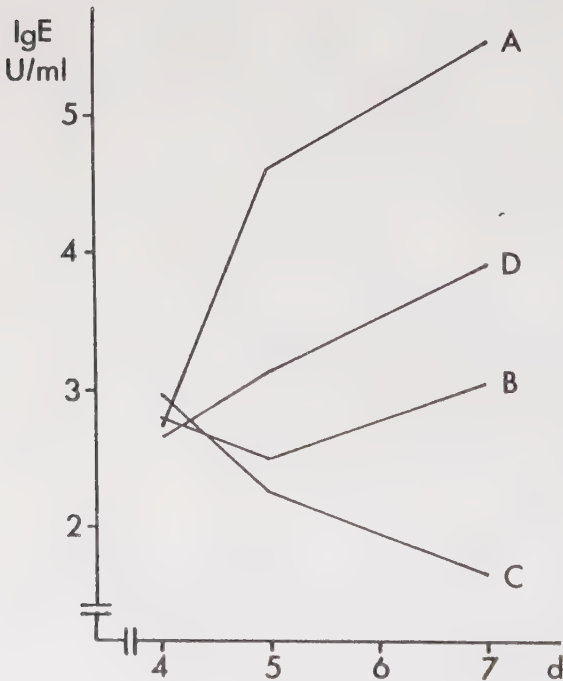


Abb. 17: Summen der IgE-Werte aus den Überständen der Zellkulturen K_0 (A), K_{PWM} (B), $K_{PWM/K1}$ (C) und K_{K1} (D) von vier Probanden nach 4, 5 und 7 Tagen Inkubation.

Bei dieser Versuchsreihe erhielten wir in drei der vier Ansätze die höchsten Werte nach dem siebten Tag, bei einem Ansatz war das Maximum schon nach vier Tagen erreicht. Wiederum waren die Differenzen bei den verschiedenen Kulturansätzen nach vier Tagen sehr gering, während die Ergebnisse nach sieben Tagen doch erheblich streuten.

Aus den Ergebnissen beider Versuchsreihen schlossen wir, daß die IgE-Konzentrationen nach längerer Inkubationsdauer der Zellkulturen ansteigen. Aus diesem Grund wurden in der Folge alle Zellen sieben Tage lang in Kultur gehalten.

3.2. Lymphozytentransformationstest bei Atopikern und Vergleichspersonen

3.2.1. Stimulation mit Mitogenen

Getrennt nach der Patientengruppe und der Kontrollgruppe wurden für die drei Mitogene PWM, PHA und Con A die Stimulationswerte aufgelistet und auf ihre Verteilung in beiden Gruppen hin mit dem Wilcoxon-Test geprüft. Als Stimulationswerte gingen in unsere Betrachtungen die Werte nach der Formel

$$\text{III) } x = (K_M - K_0)$$

ein. K_M ist dabei der Zählwert des Mitogenansatzes, K_0 der Zählwert des Leeransatzes. Wir fragten nach Verteilungsunterschieden, wobei wir als Signifikanzniveau $p = 0,05$ festlegten.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 18 dargestellt. Nur bei der Stimulation mit PWM fanden wir einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden vergliche-

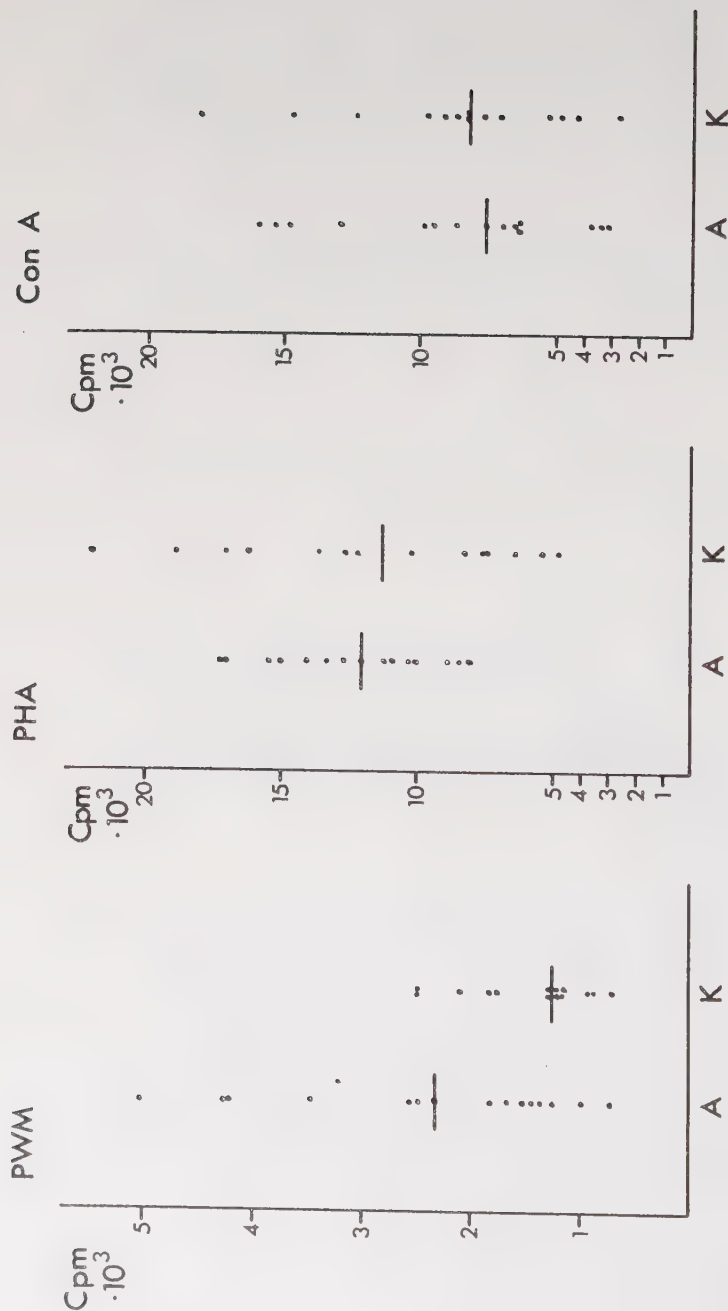


Abb. 18: Verteilung der Zählwerte ($K_M - K_0$) bei Atopikern (A; $n = 15$) und Kontrollpersonen (K; $n = 14$) nach Mitogenstimulation. Die Querstriche geben die Mediane an.

nen Gruppen nach siebentägiger Inkubation ($p < 0,05$). Dabei lagen die Werte der Patienten höher als die der Kontrollpersonen. Die Variationsbreite bei den Atopikern bewegte sich zwischen 752 Cpm und 5031 Cpm, der Median betrug 1801 Cpm. Die entsprechenden Werte für die Kontrollpersonen lauten 736 Cpm bis 2489 Cpm (Variationsbreite) bzw. 1234 Cpm (Median).

Erheblich höhere Werte lieferten die Versuche mit den beiden anderen Mitogenen PHA und Con A, es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Atopikern und Vergleichspersonen aufgefunden werden. Die wichtigsten Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

	PWM		PHA		Con A	
	A	K	A	K	A	K
Vb min	752	736	8157	4944	3081	2713
max	5031	2489	17059	30783	15913	18168
m	1801	1234	12182	11315	7640	8198
S	$p < 0,05$		n.s.		n.s.	

Tab. 14: Thymidineinbauraten (Cpm) nach Mitogenstimulation bei Atopikern und Kontrollpersonen.

Vb : Variationsbreite

min: minimaler Wert

max: maximaler Wert

m : Median

S : Signifikanz

A : Atopiker

K : Kontrollpersonen

3.2.2. Stimulation mit Allergenen

Die drei verwendeten Allergene wurden bei diesen Kulturansätzen in den drei Konzentrationen $A1 = 10^{-1}$, $A2 = 10^{-2}$ und $A3 = 10^{-3}$ der Stammlösungen eingesetzt.

Die Zählraten dieser Kulturen wurden zu K_0 in Beziehung gesetzt nach der Formel

$$\text{IV) } I = \frac{K_A}{K_0}$$

K_A bezeichnet die Zählraten (Cpm) in den Kulturen mit Allergenen, K_0 die der Leerkulturen.

Wir verglichen die Verteilung der Indices bei der Patientengruppe und der Kontrollgruppe für die jeweils entsprechenden Allergene in denselben Konzentrationen. Als statistischer Test wurde wiederum der Wilcoxon-Test herangezogen. Gleichzeitig berechneten wir aus den Indices die Mittelwerte $\bar{x}$, die Standardabweichungen s und die mittleren Fehler der Mittelwerte $s_{\bar{x}}$. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgelistet. Diese Parameter dienen als die Größen der graphischen Darstellungen in den Abbildungen 19 bis 21, die die Beeinflussung der Indices durch unterschiedliche Allergenkonzentrationen, jeweils getrennt für Patienten und Kontrollpersonen, zeigen.

Bei der statistischen Auswertung der Daten ergaben sich Verteilungsunterschiede zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe nur bei Inkubation der Kulturen mit Katzenepithel. In den Konzentrationen $K1$ und $K3$ waren die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit niedrigeren Werten bei den Atopikern statistisch signifikant ($p < 0,05$).

	A	Ko	A	Ko	A	Ko
	K 1		D 1		G 1	
Vb	0,48 - 1,68	0,65 - 3,80	0,43 - 2,53	0,66 - 2,05	0,46 - 1,71	0,87 - 2,82
$\bar{x}$	0,89	1,52	1,16	1,22	1,33	1,43
s	0,38	0,94	0,45	0,42	0,34	0,52
$s_{\bar{x}}$	0,10	0,25	0,11	0,11	0,09	0,14
	K 2		D 2		G 2	
Vb	0,37 - 1,51	0,55 - 2,23	0,69 - 1,85	0,48 - 2,08	0,74 - 2,38	0,68 - 1,90
$\bar{x}$	0,88	1,14	1,13	1,20	1,13	1,17
s	0,31	0,52	0,29	0,39	0,42	0,33
$s_{\bar{x}}$	0,08	0,14	0,07	0,10	0,11	0,08
	K 3		D 3		G 3	
Vb	0,60 - 1,99	0,60 - 3,14	0,57 - 1,60	0,57 - 1,94	0,63 - 1,98	0,60 - 2,12
$\bar{x}$	1,15	1,43	1,06	1,15	1,07	1,12
s	0,37	0,61	0,26	0,37	0,33	0,40
$s_{\bar{x}}$	0,10	0,16	0,07	0,10	0,09	0,11

Tab. 15: Lymphozytenstimulation mit den Allergen Katzenepithel (K), Hausstaubmilbe (D) und Gräserpollen (G) in den Konzentrationen 1, 2 und 3.

Tabelliert sind Variationsbreiten (Vb), Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (s) und mittlere Fehler der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) der Stimulationsindizes (Formel IV, S. 80) von Atopikern (A) und Kontrollpersonen (Ko).

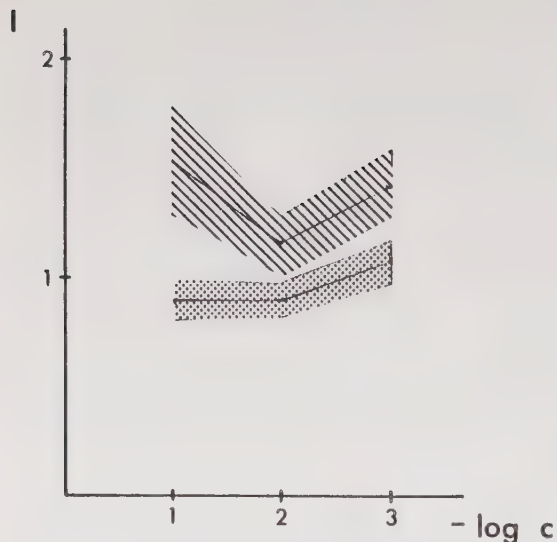


Abb. 19: Lymphozytenstimulation mit Katzenepithelextrakt in verschiedenen Verdünnungen. Eingezeichnet sind die Indices I (s. Formel IV, S. 80) ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 14 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Die Allergenkonzentrationen sind angegeben als negative dekadische Logarithmen der Verdünnungen aus der Stammlösung.

Während in den Einzelbeobachtungen die Einflüsse der Allergene erheblich sein konnten - wie die Variationsbreiten in der Tabelle 13 ausweisen - näherten sie sich im Mittel für beide Gruppen dem Wert 1 an. Größere Abweichungen der Mittelwerte vom Wert 1 wurden bei den Kontrollpersonen bei den Versuchsansätzen K_{K1} , K_{K3} und K_{G1} beobachtet, bei der Patientengruppe beim Versuchsansatz K_{G1} .

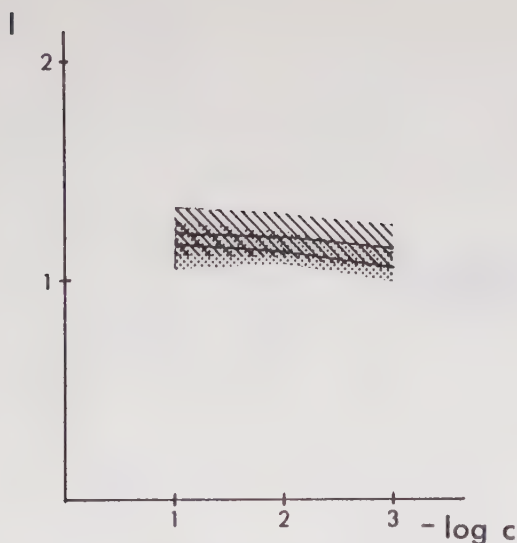


Abb. 20: Lymphozytenstimulation mit Hausstaubmilbenextrakt in verschiedenen Verdünnungen. Eingezeichnet sind die Indices I (s. Formel IV, S. 80) ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 15 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Allergenkonzentrationen in negativen dekadischen Logarithmen der Verdünnungen aus der Stammlösung.

Betrachtet man die unterschiedlichen Allergenkonzentrationen innerhalb der Gruppen, lassen sich nur bei der Kontrollgruppe zwischen K_{K1} und K_{K2} statistisch signifikante Unterschiede nachweisen. Alle übrigen erbrachten keine Signifikanz.

Als auffällige, nicht statistisch zu sichernde Beobachtungen sollen schließlich noch erwähnt sein:

Katzenepithel wirkte bei den Patienten in den Konzentra-

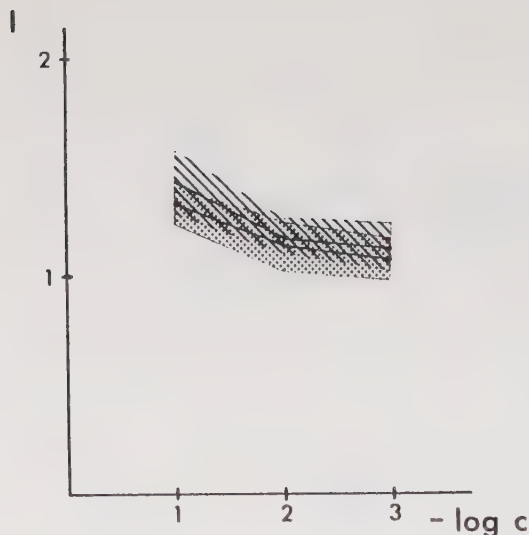


Abb. 21: Lymphozytenstimulation mit Gräserpollen in verschiedenen Verdünnungen. Eingezeichnet sind die Indices I (s. Formel IV, S. 80) ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 15 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Allergenkonzentrationen in negativen dekadischen Logarithmen der Verdünnungen aus der Stammlösung.

tionen K1 und K2 im Durchschnitt hemmend auf die spontane Mitoserate, K3 erbrachte einen geringen Anstieg. Dieses Bild zeigt sich auch dann, wenn die Indices der einzelnen Versuchspersonen beurteilt werden. Bei zehn Atopikern lagen sie unter dem Wert 1 für K1, bei nur einem über 1,5. Für K3 waren nur noch sechs Indices niedriger als 1, die diesem Wert aber angenähert waren, und immerhin schon drei über 1,5. Bei den Kontrollpersonen konnten wir für K1 drei Indices beobachten, die größer waren als 2,5. Für K2 konnten bei den Kontrollpersonen nur noch zwei Werte gefunden

werden, die größer waren als 2.

Die Inkubation mit Hausstaubmilbe erbrachte in beiden Gruppen bei allen Konzentrationen ein gleichförmiges Bild, das sich auch in der Häufigkeit der Indices, die kleiner als 1 und größer als 1,5 waren, in gleicher Weise ausprägte.

Bei den Gräserpollen konnte ein geringer stimulierender Effekt in beiden Gruppen in der hohen Konzentration G1 beobachtet werden, den G2 und G3 nicht mehr auslösen konnten.

3.2.3. Kombinierte Stimulation mit Mitogenen und Allergenen

3.2.3.1. Allergenkonzentration $c_1 = 10^{-1}$ der Stammlösungen

Die Zählraten der Kulturen, die sowohl mit Mitogenen wie mit Allergenen stimuliert worden waren, wurden mit den Kulturen, die alleine mit Mitogenen versetzt worden waren, in Beziehung gesetzt nach der Formel

$$v) \quad y = \frac{K_{M/A} - K_0}{K_M - K_0}$$

Es wurden also die Werte aus den Leerkulturen K_0 von den Werten aus den Mitogen/Allergen-Kulturen und den Mitogen-Kulturen als spontane Thymidin-Einbauraten subtrahiert. Die Differenzen wurden dann nach Art eines Stimulationsindex durcheinander dividiert. Die Formel gibt demnach das Verhältnis der Mitogen/Allergen-Kultur zur Mitogen-Kultur an. Damit Werte < 0 und Werte > 0 erscheinen, wurde von dem Ergebnis dieser Formel jeweils 1 subtra-

hiert, so daß in unseren Abbildungen die Differenzen

$$VI) \quad y' = \frac{K_{M/A} - K_0}{K_M - K_0} - 1$$

dargestellt sind.

Werte, die in den graphischen Darstellungen im positiven Bereich oberhalb der Ordinate gelegen sind, zeigen demnach eine Steigerung der Thymidin-Einbaurate in den Mitogen/Allergen-Kulturen gegenüber den Mitogen-Kulturen an, Werte im negativen, unteren Bereich bedeuten eine Hemmung.

Die Differenzen sind in Klassen von jeweils 0,1 ($\hat{=}$ 10 % der Mitogenkulturen) eingeteilt. Die im positiven bzw. im negativen Bereich die Klassengrenzen bildenden Werte sind in den entsprechenden Feldern eingetragen. Demnach wurden z. B. Werte $0 \leq x < 0,1$ im ersten positiven Feld angegeben, Werte $0 < x \leq - 0,1$ im ersten negativen Feld usw.

n bezeichnet die Anzahl der für die verschiedenen Klassen gefundenen Werte, unterschieden nach der Patientengruppe und der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der Kontrollpersonen sind horizontal schraffiert, die der Patientengruppe gepunktet dargestellt.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test (Signifikanzniveau $p = 0,05$).

3.2.3.1.1. Stimulation mit Pokeweed Mitogen und Katzenepithel (c_1)

In beiden Gruppen konnten wir bei dieser Versuchsanordnung erhebliche hemmende Wirkungen des Katzenepithalex-

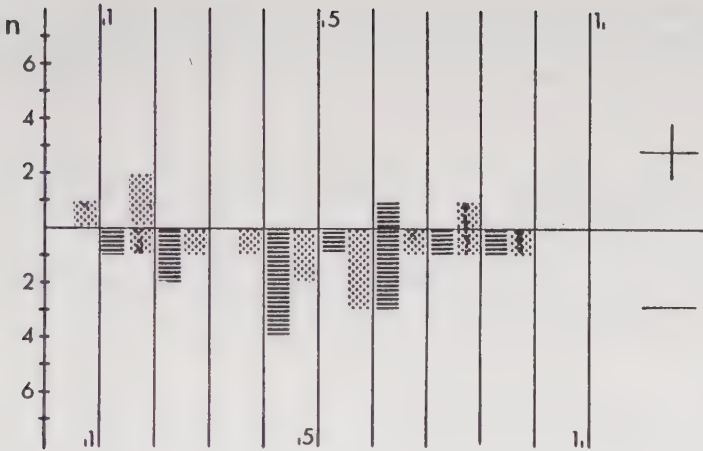


Abb. 22: Einfluß von Katzenepithelextrakt (Konzentration 1) auf die PWM-induzierte Thymidineinbaurate. Verteilung der nach Formel VI (S. 86) erhaltenen Ergebnisse bei 15 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung der Graphik s. S. 85/86.

trakts beobachten. Sowohl bei den Patienten wie bei den Vergleichspersonen wurden Werte von bis zu - 0,9 erreicht.

Die Modi beider Gruppen liegen in etwa der gleichen Größenordnung - bei der Kontrollgruppe ($n = 4$) zwischen - 0,41 und - 0,5, bei der Patientengruppe zwischen - 0,51 und - 0,6 ($n = 3$) - ebenso wie die Mediane, die bei beiden Gruppen um - 0,5 abgelesen werden können.

In drei Fällen konnten bei den Atopikern geringfügige Steigerungen um 20 % beobachtet werden. Steigerungen waren bei ihnen häufiger zu finden (4mal) als bei den Vergleichspersonen. In drei Fällen konnten bei den Ato-

pikern geringfügige Steigerungen um bis zu 20 % gefunden werden. In jeweils einem Fall in beiden Gruppen waren die Anstiege der Meßwerte ausgesprochen hoch mit mehr als 60 % bzw. 70 %.

Die Verteilungen in den beiden Gruppen sind statistisch nicht unterschiedlich.

3.2.3.1.2. Stimulation mit Pokeweed Mitogen und Hausstaubmilbe (c_1)

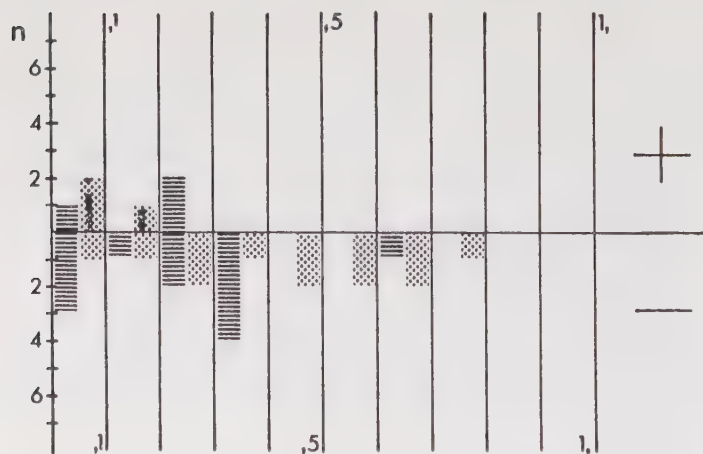


Abb. 23: Einfluß von Hausstaubmilbenextrakt (c_1) auf die PWM-induzierte Thymidineinbaurrate. Verteilung der nach Formel VI (S. 86) erhaltenen Ergebnisse bei 15 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 85/86

In nur jeweils drei Versuchen konnte hier ein den Thymidineinbau fördernder Effekt durch Hausstaubmilbenextrakt

auf die PWM-Stimulation festgestellt werden, wobei dieser Effekt immer nur gering war und bei der Kontrollgruppe ein Maximum von + 0,22 erreichte, bei der Atopikergruppe ein Maximum von + 0,17.

Während bei der Vergleichsgruppe eine Häufung der Werte im mäßig negativen Bereich bis - 0,4 mit einem Ausreißer bei - 0,65 beobachtet werden konnte, verteilten sich die Ergebnisse bei der Atopikergruppe auf alle Klassen zwischen + 0,19 und - 0,80. Eine Bevorzugung einer Klasse war nicht zu erkennen.

Der Wilcoxon-Test ließ nicht auf Verteilungsunterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen schließen.

3.2.3.1.3. Stimulation mit Pokeweed Mitogen und Gräserpollen (c_1)

Bei dieser Versuchsanordnung wurden bei beiden Gruppen in nur jeweils einem Fall eine geringfügige Steigerung der Mitogenstimulation durch das Allergen beobachtet, die keine 10 % erreichten.

In beiden Gruppen konnten zum Teil starke Abfälle der Thymidin-Einbauraten durch das Allergen erzielt werden, die bei der Patientengruppe deutlicher waren als in der Kontrollgruppe; bei der ersteren erscheint die Verteilung weiter nach rechts verschoben als bei letzterer. Der Modus lag bei den Atopikern zwischen - 0,7 und - 0,8 ($n = 4$), der Median bei - 0,43; die entsprechenden Werte für die Kontrollgruppe lauten - 0,3 bis - 0,4 für den Modus ($n = 3$) und - 0,255 für den Median.

Die statistische Prüfung konnte keine Unterschiede zwi-

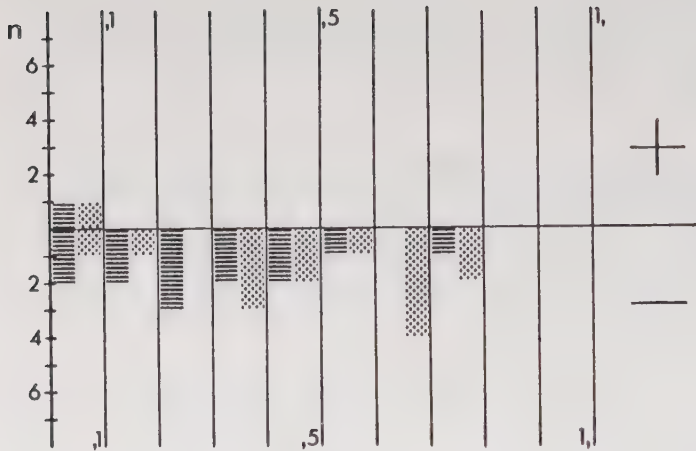


Abb. 24: Einfluß von Gräserpollen (c_1) auf die PWM-induzierte Thymidineinbaurrate. Verteilung der nach Formel VI (S.86) erhaltenen Ergebnisse bei 15 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zu Graphik s. S. 85/86.

schen den Gruppen aufzeigen.

3.2.3.1.4. Stimulation mit Phytohämagglutinin und Katzenepithel (c_1)

Bei der Hälfte der Kontrollpersonen konnten in den Mitogen/Allergen-Kulturen höhere Werte gemessen werden als in den Mitogen-Kulturen; bei einer Person erreichte die Kultur, der das Allergen zugesetzt war, das 1,69-fache des Ausgangswertes in der Kultur, welche allein mit Mitogen stimuliert worden war. Bei der anderen Hälfte konnte eine Hemmung zwischen 20 % und 50 % des Mitogenwertes festgestellt werden.

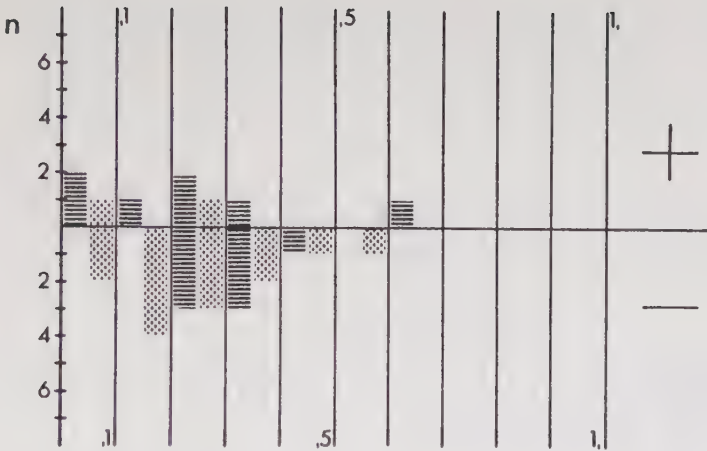


Abb. 25: Einfluß von Katzenepithel auf die PHA-induzierte Thymidineinbaurate. Verteilung der nach Formel VI (S. 86) erhaltenen Ergebnisse bei 15 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 85/86.

Bei der Gruppe der Patienten mit atopischem Ekzem war der Effekt des Allergenzusatzes hingegen eher negativ. Nur bei zwei Versuchen konnten die Werte in der PHA/K1-Kultur gegenüber der PHA-Kultur höher bestimmt werden (bei einem um einen Faktor zwischen 0 und 0,1, beim anderen um einen Faktor zwischen 0,2 und 0,3). Bei den 13 anderen Versuchen wurden zum Teil stark erniedrigte Werte gemessen. Der Modus der Atopiker ($n = 4$) lag zwischen - 0,11 und - 0,20, ebenso der Median. Der niedrigste Wert wurde zwischen - 0,51 und - 0,60 gefunden.

3.2.3.1.5. Stimulation mit Phytohämagglutinin und Hausstaubmilbenextrakt (c_1)

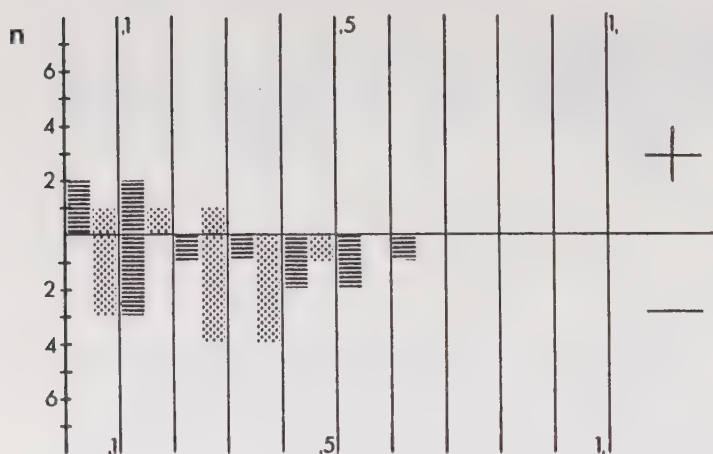


Abb. 26: Einfluß von Hausstaubmilbenextrakt (c_1) auf die PHA-induzierte Thymidineinbaurrate. Verteilung der nach Formel VI (S. 86) erhaltenen Ergebnisse bei 15 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 85/86.

In der Mehrzahl der Fälle, sowohl bei der Patientengruppe wie bei der Kontrollgruppe, wirkte das Allergen (Dermatophagoides pteronyssinus; Hausstaubmilbe) hemmend auf den Thymidin-Einbau. Bei den Patienten wurde in neun von 15 Fällen die Thymidineinbaurrate um mehr als 20 % erniedrigt, bei nur drei Versuchen wurde ein positiver Effekt festgestellt, der in einem Fall mit einem Faktor von 0,1 vernachlässigbar klein war und einen maximalen Faktor von bis zu 0,3 aufwies.

Bei den Kontrollpersonen stellte sich das Bild ähnlich dar: In vier von 14 Fällen eine nur unwesentliche Steigerung, in zehn Fällen eine Hemmung; der Median der Ergebnisse lag bei $-0,18$ (bei den Atopikern zwischen $-0,2$ und $-0,3$), die maximale Hemmung bei $-0,69$.

Charakteristische Unterschiede ließen sich zwischen den zwei Gruppen durch die statistische Prüfung nicht ausmachen.

3.2.3.1.6. Stimulation mit Phytohämagglutinin und Gräserpollen (c_1)

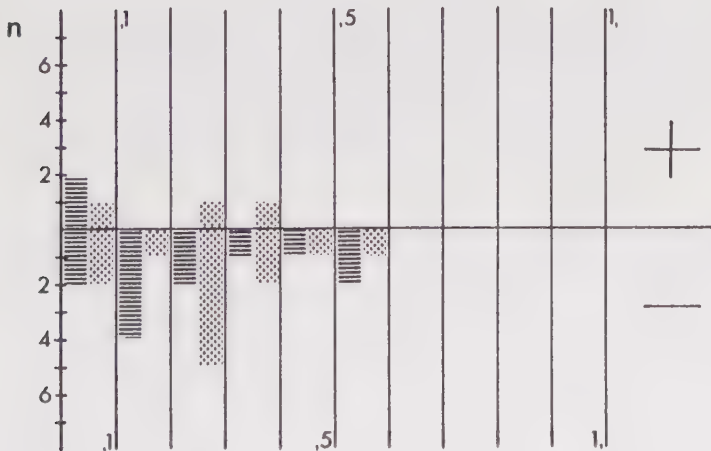


Abb. 27: Einfluß von Gräserpollen (c_1) auf die PHA-induzierte Thymidineinbaurate. Verteilung der nach Formel VI (S. 86) erhaltenen Ergebnisse bei 15 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 85/86.

Auch bei dieser Versuchsanordnung wurde nur bei wenigen Personen eine Steigerung in den gemischten Kulturen gegenüber den Mitogenkulturen festgestellt. Die positiven Ergebnisse der Kontrollpersonen ($n = 2$) übertrafen keine 10 % und sind damit nicht stark zu bewerten. Bei den Atopikern waren es nur zwei Zellkulturen, die einen größeren Wert als + 0,2 aufwiesen.

Im negativen Bereich erreichten sowohl ein Patient als auch zwei Kontrollpersonen Werte von kleiner als - 0,5. Bei der Kontrollgruppe konnte ein Modus zwischen - 0,11 und - 0,2 ($n = 4$), bei den Atopikern zwischen - 0,21 und - 0,3 ($n = 5$) abgelesen werden, Werte, die den Medianen der jeweiligen Gruppen entsprechen.

Statistische Unterschiede konnten nicht aufgezeigt werden.

3.2.3.1.7. Stimulation mit Concanavalin A und Katzenepithel (c_1)

Beide Gruppen zeigen rechtsgipflige Verteilungen im stark negativen Bereich, die bei der Patientengruppe noch stärker ausgeprägt ist als bei der Vergleichsgruppe. Der Modus bei den Atopikern liegt mit $n = 6$ in der Klasse zwischen - 0,81 und - 0,90, bei den Kontrollpersonen zwischen - 0,71 und - 0,80 ($n = 5$). Die Mediane wurden mit 0,815 bei den Patienten und mit - 0,64 bei den Kontrollpersonen bestimmt.

In nur einem Fall konnte bei den Kontrollen eine geringe Steigerung von + 0,07 erzielt werden. Der höchste Wert bei den Atopikern lag bei - 0,59.

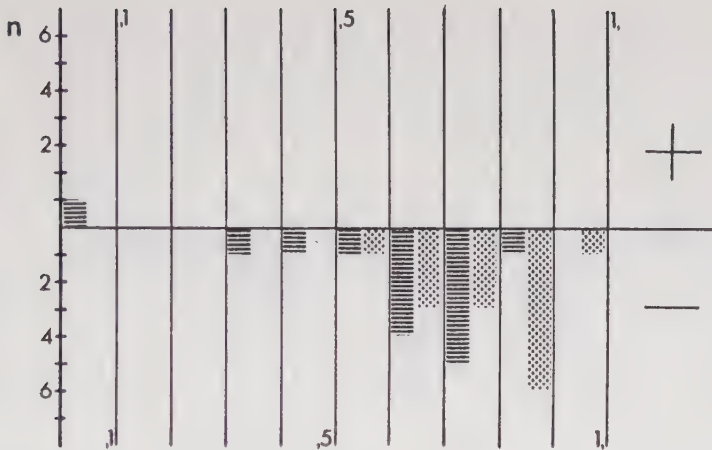


Abb. 28: Einfluß von Katzenepithel (c_1) auf die Con A-induzierte Thymidineinbaurrate. Verteilung der nach Formel VI (S. 86) erhaltenen Ergebnisse bei 14 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 85/86.

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war bei diesem Versuchsansatz mit $p < 0,05$ statistisch signifikant.

3.2.3.1.8. Stimulation mit Concanavalin A und Hausstaubmilbenextrakt (c₁)

In beiden Gruppen wurden stark hemmende Effekte festgestellt; bei einem Probanden der Kontrollgruppe fiel der Wert bis auf unter 20 % des Ausgangswertes ab, bei nur einer Versuchsperson war ein positiver Wert zu beobachten. In der Kontrollgruppe wurden zwei Modi mit jeweils $n = 4$ in den Klassen zwischen $-0,31$ und $-0,40$ sowie zwischen $-0,51$ und $-0,60$ abgelesen. Der Median lag bei $-0,48$.

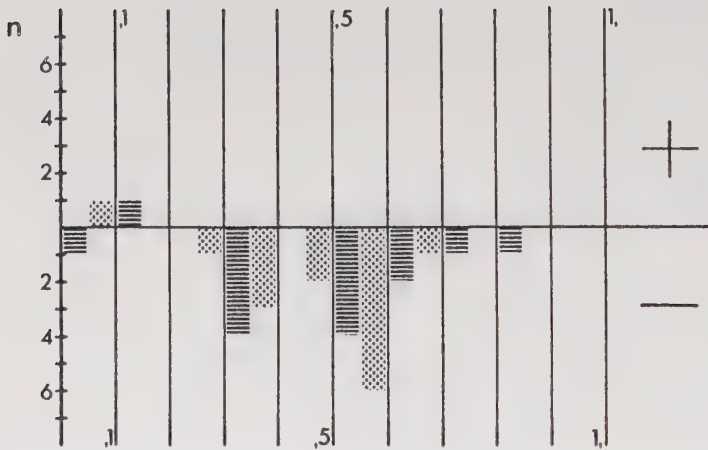


Abb. 29: Einfluß von Hausstaubmilbenextrakt (c_1) auf die Con A-induzierte Thymidineinbaurrate. Verteilung der nach Formel VI (S. 86) erhaltenen Ergebnisse bei 14 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 85/86.

Die Verteilung der Patientengruppe ist ähnlich mit nur einer positiven Reaktion, während bei allen anderen Versuchen ausgeprägte Hemmungen auftraten. Der Modus mit $n = 6$ lag in der Klasse zwischen $- 0,51$ und $- 0,60$, der Median bei $- 0,495$.

Statistische Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

3.2.3.1.9. Stimulation mit Concanavalin A und Gräserpollen (c_1)

Bei diesem Versuchsansatz wurden in beiden Gruppen sowohl positive als auch negative Wirkungen des Allergens auf

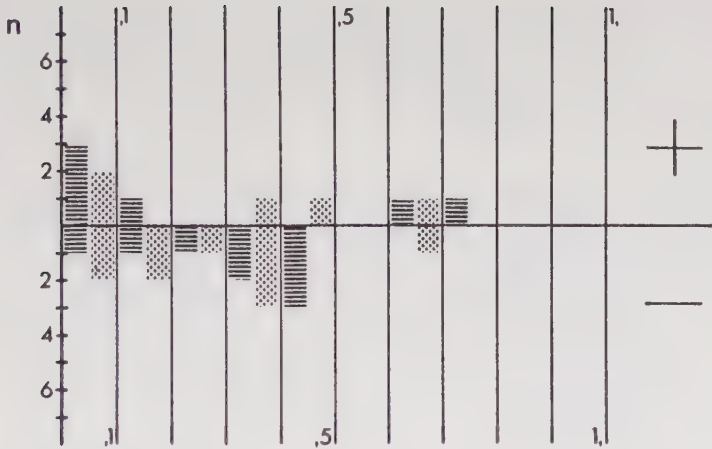


Abb. 30: Einfluß von Gräserpollen (c_1) auf die Con A-induzierte Thymidineinbaurrate. Verteilung der nach Formel VI (S. 86) erhaltenen Ergebnisse bei 14 Atopikern (gepunktet) und 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 85/86.

die Mitogenstimulation beobachtet. Die Ergebnisse waren breit verteilt zwischen + 0,7 und - 0,67, wobei keine wesentlichen Differenzen zwischen Atopikern und Kontrollpersonen ausgemacht werden konnten. Dies bestätigte auch die statistische Prüfung, die keine Signifikanz aufwies.

In der Kontrollgruppe wurden zwei Modi in den Klassen zwischen 0,0 und + 0,09 sowie - 0,31 und - 0,40 festgestellt, bei der Patientengruppe ein Modus in der Klasse - 0,41 bis - 0,50. Die Mediane lagen bei - 0,10 bei den Kontrollen bzw. bei - 0,07 bei den Atopikern.

3.2.3.2. Unterschiede der kombinierten Stimulation
bei Verwendung verschiedener Allergenkonzen-
trationen $c_1 = 10^{-1}$ und $c_2 = 10^{-2}$ der Stamm-
lösungen

Die folgenden Histogramme zeigen die Differenzen in den mit Mitogenen und mit Allergenen der verschiedenen Konzentrationen c_1 (Verdünnung der Stammlösungen 1:10) und c_2 (Verdünnung der Stammlösungen 1:100) inkubierten Kulturen. Für die Mitogen/Allergen-Kulturen beider Allergenkonzentrationen wurden nach Formel V (S. 85) die Stimulationsindices gebildet und dann voneinander subtrahiert.

Diese Rechenoperation wurde nach der Formel

$$\text{VII) } y = \frac{K_{M/A1} - K_0}{K_M - K_0} - \frac{K_{M/A2} - K_0}{K_M - K_0}$$

durchgeführt (zur Erklärung s. auch S. 85).

Die aus dieser Formel erhaltenen Ergebnisse sind getrennt für Atopiker und Kontrollpersonen in derselben Weise wie in 3.2.3.1. in Form von Histogrammen dargestellt.

Werte, die danach größer oder gleich 0 waren, wurden im positiven, oberen Bereich eingetragen. Dies galt für solche, die in $K_{M/A1}$ (der Kultur mit der höheren Allergenkonzentration) größere oder gleich große Stimulationsindices aufwiesen wie in $K_{M/A2}$. Werte kleiner 0 ($\Rightarrow K_{M/A1} < K_{M/A2}$) wurden entsprechend im negativen Bereich aufgeführt.

Falls demnach die Stimulation mit Mitogen und dem höher konzentrierten Allergen A1 zu einem höheren Stimulationsindex führte als mit der Allergenkonzentration A2 - unab-

hängig davon, ob A1 zu einer Steigerung oder zu einer Hemmung der reinen Mitogenstimulation beigetragen hatte -, so erscheinen bei dieser Berechnung positive Werte. A2 mußte in diesem Fall eine noch stärkere Hemmung bzw. eine schwächere Proliferation bewirkt haben.

Erscheinen negative Werte, so besaß A2 eine geringer hemmende bzw. eine stärker proliferative Wirkung als A1. Zwischen diesen Richtungen - geringere Hemmung bzw. stärkere Proliferation - wurde nicht unterschieden.

Auch für diese Betrachtung wurde die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Test bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ durchgeführt.

3.2.3.2.1. Differenzen der Stimulationsindices kombinierter Stimulationen bei den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 mit Katzenepithel und dem Mitogen PWM

In der Mehrzahl der Versuche führte die 10-fach niedrigere Dosis K2 des Allergens zu nur geringfügigen Änderungen bei der Stimulation mit PWM in beiden Gruppen. Sechs der Kontrollpersonen und acht der Atopiker zeigten ein Ergebnis von $\pm 10\%$ Differenz.

Bei der Vergleichsgruppe waren die Meßwerte in $K_{PWM/K1}$ häufiger kleiner (neun von 14) als in $K_{PWM/K2}$, bei den Patienten war es umgekehrt (sieben von 15 waren kleiner). Größere Differenzen traten nur bei Einzelbeobachtungen auf, schwerpunktmäßig lagen die Abweichungen um $\pm 20\%$. Vor allem gilt dies für die Patienten, bei denen in nur drei Fällen größere Unterschiede beobachtet werden konnten.

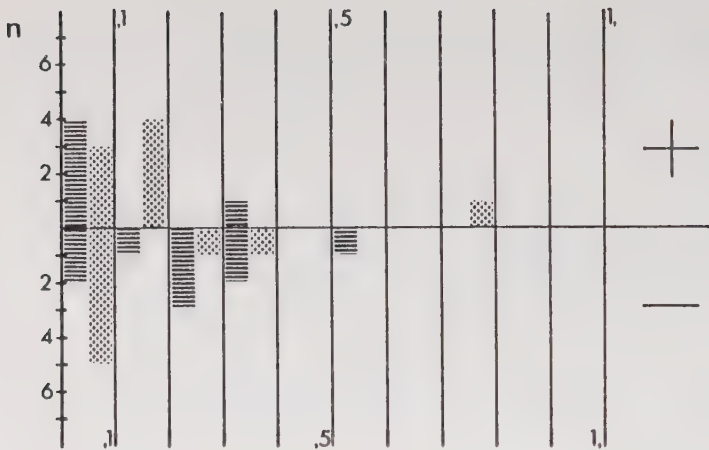


Abb. 31: Differenzen der Stimulationsindices bei kombinierten Stimulationen mit den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 . Als Mitogen wirkte PWM, als Allergen Katzenepithel. Verteilung der nach Forme VII (S. 98) gefundenen Werte bei 15 Atopikern (gepunktet) und bei 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 98/99.

Verteilungsunterschiede konnten durch die Statistik nicht gesichert werden.

3.2.3.2.2. Differenzen der Stimulationsindices kombinierter Stimulationen bei den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 von Hausstaubmilbenextrakt mit dem Mitogen PWM

Beim Vergleich der mit PWM und dem in den zwei Konzentrationen D1 und D2 eingesetzten Allergen des Hausstaubmilbenextrakts (Dermatophagoides pteronyssinus) stimulierten Kulturen zeigte sich überwiegend eine nur geringe An-

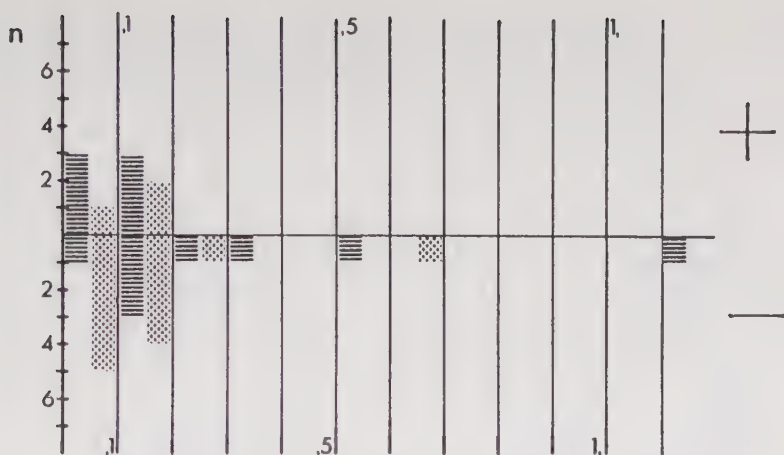


Abb. 32: Differenzen der Stimulationsindices bei kombinierten Stimulationen mit den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 . Als Mitogen wirkte PWM, als Allergen Hausstaubmilbenextrakt. Verteilung der nach Formel VII (S. 98) gefundenen Werte bei 15 Atopikern (gepunktet) und bei 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 98/99.

derung der Werte zwischen $\pm 20\%$ in beiden Gruppen. Immerhin 23 der 29 Werte lagen in den vier Klassen zwischen $+0,19$ und $-0,20$. Die übrigen verteilten sich ohne erkennbaren Schwerpunkt als Einzelergebnisse in einem breiten Feld bis zu $-1,20$.

Es lagen mehr Werte in den negativen Feldern als in den positiven; die höheren Konzentrationen D1 des Allergens führten also häufiger zu niedrigeren Meßwerten als die kleineren D2.

Die Verteilungen der Gruppen sind statistisch gleich.

3.2.3.2.3. Differenzen der Stimulationsindices kombinierter Stimulationen bei den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 von Gräserpollen mit dem Mitogen PWM

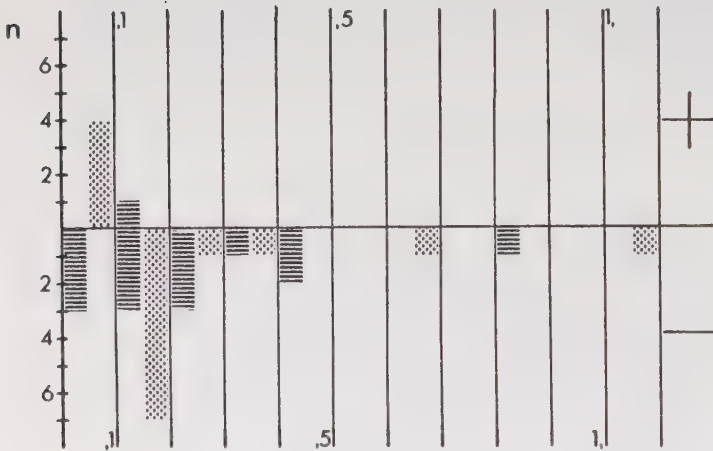


Abb. 33: Differenzen der Stimulationsindices bei kombinierten Stimulationen mit den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 . Als Mitogen wirkte PWM, als Allergen Gräserpollen. Verteilung der nach Formel VII (S. 98) gefundenen Werte bei 15 Atopikern (gepunktet) und bei 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 98/99.

Ähnlich wie bei den zuvor besprochenen Ansätzen konstruierten wir hier ein vorwiegend negatives Profil mit einer Häufung der Werte um den Nullwert und einer breiten Verteilung von Einzelbeobachtungen in den Klassen bis zu - 1,10.

Ausgeprägt ist der Modus bei den Atopikern mit $n = 7$ in der Klasse - 0,11 bis - 0,20. Einige wenige Werte waren positiv. Statistische Unterschiede konnten zwischen den beiden Gruppen nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnten wir bei Stimulationen mit PWM und Allergenen eine stärker hemmende Beeinflussung der Mitogenstimulation durch die höher konzentrierten Allergenlösungen feststellen. Beim Einsatz der niedrigeren Konzentrationen fand eine Annäherung an die Ausgangswerte statt.

3.2.3.2.4. Differenzen der Stimulationsindices kombinierter Stimulationen bei den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 von Katzenepithel mit dem Mitogen PHA

Anders als bei allen anderen Vergleichen beim Einsatz von unterschiedlichen Allergenkonzentrationen in die Mitogenstimulationen fanden wir bei diesem Versuch ein eher positives Histogramm-Bild ohne wesentliche Verteilungsunterschiede in den beiden Gruppen.

Die niedrigere Allergenkonzentration K2 ergab zusammen mit dem Mitogen PHA kleinere Werte als K1. Zusammen mit dem Ergebnis aus 3.2.3.1.4., in dem die überwiegend hemmende Eigenschaft des Katzenepithels K1 auf die PHA-Stimulation gezeigt wurde, kann man auf eine noch stärkere negative Wirkung von K2 bei Mitogenstimulation mit PHA schließen. Die Modi in beiden Gruppen lagen in der Klasse zwischen + 0,20 und + 0,29 (jeweils $n = 4$), die Mediane in der Klasse + 0,10 bis + 0,19.

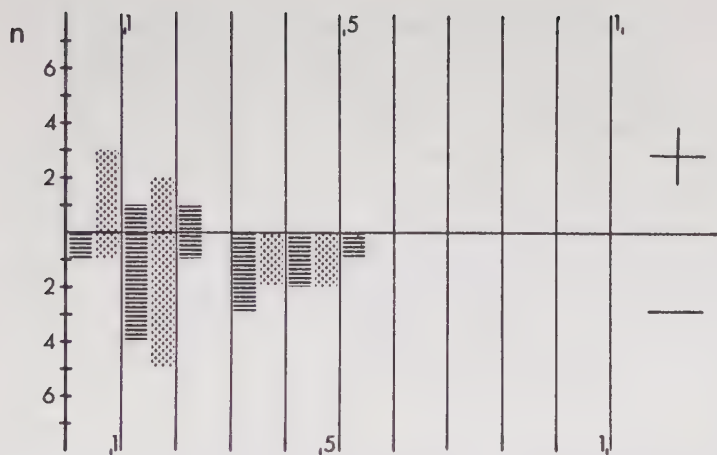


Abb. 35: Differenzen der Stimulationsindices bei kombinierten Stimulationen mit den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 . Als Mitogen wirkte PHA, als Allergen Hausstaubmilbenextrakt. Verteilung der nach Formel VII (S. 98) gefundenen Werte bei 15 Atopikern (gepunktet) und bei 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 98/99.

mulation verursachte, konnten wir durch D2 eine Annäherung an die Ausgangswerte der reinen Mitogenstimulation beobachten. Tatsächlich waren in D2 die Abweichungen vom Mitogenwert im Schnitt nicht größer als $\pm 20\%$. Bei den Atopikern wurde kein einziger Wert gemessen, der diese Grenzen überschritt.

Die Differenzen unterschieden sich in ihren Verteilungen bei den beiden verglichenen Gruppen nicht.

3.2.3.2.6. Differenzen der Stimulationsindices kombinierter Stimulationen bei den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 von Gräserpollen mit dem Mitogen PHA

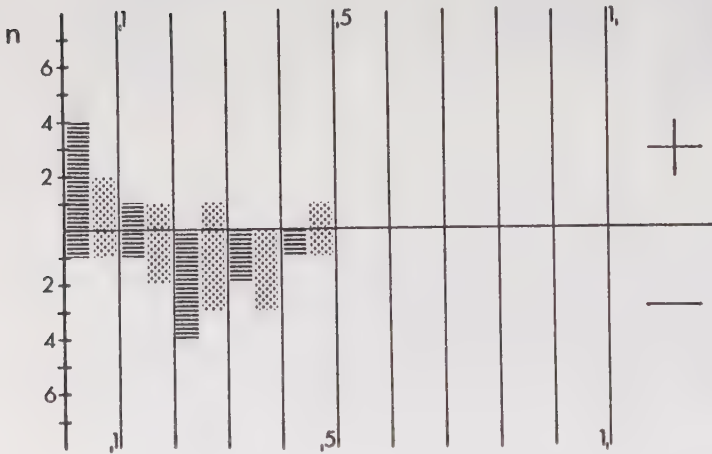


Abb. 36: Differenzen der Stimulationsindices bei kombinierter Stimulation mit den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 . Als Mitogen wirkte PHA, als Allergen Gräserpollen. Verteilung der nach Formel VII (S. 98) gefundenen Werte bei 15 Atopikern (gepunktet) und bei 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 98/99.

In diesem Histogramm fanden wir sowohl positive als auch negative Wirkungen durch die kleinere Allergenkonzentration G_2 , wobei der negative Bereich stärker betont erscheint. Statistisch konnten keine Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden, wenngleich

die positiven Effekte bei den Kontrollpersonen weniger stark ausgeprägt erschienen als bei den Patienten.

Bei der Betrachtung der Zahlenwerte fanden wir wiederum eine Annäherung an die Mitogenwerte bei den niedrigeren Allergenkonzentrationen. Dies ließ sich auch an jenen Kulturen feststellen, die in $K_{PHA/G1}$ höhere Werte als in K_{PHA} erbracht hatten. Insbesondere die Kulturen, die eine starke Abweichung bei G1 aufgewiesen hatten, reagierten deutlich weniger bei G2, während jene, die mit G1 kaum verändert worden waren, auch mit G2 wenig beeinflusst wurden.

3.2.3.2.7. Differenzen der Stimulationsindizes kombinierter Stimulationen bei den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 von Katzenepithel mit dem Mitogen Con A

Das Histogramm zeigt ein ausgeprägtes, negatives Profil mit einer de-Moivre-ähnlichen Verteilung bei den Atopikern. Median und Modus finden sich bei den Patienten in der Klasse - 0,31 bis - 0,40 ($n = 6$), bei der Vergleichsgruppe beobachtet man zwei Modi ($n = 3$) in den Klassen - 0,21 bis - 0,30 und - 0,31 bis - 0,40, der Median liegt wie bei den Patienten in der Klasse - 0,31 bis - 0,40.

Das Ergebnis ist Ausdruck für die weit geringere Wirkung des Allergens in der Konzentration K2. K1 hatte zusammen mit Con A eine außerordentlich starke Hemmung der Zellproliferation verursacht, die bei K2 immer noch nachweisbar war, aber in erheblich geringerem Ausmaß.

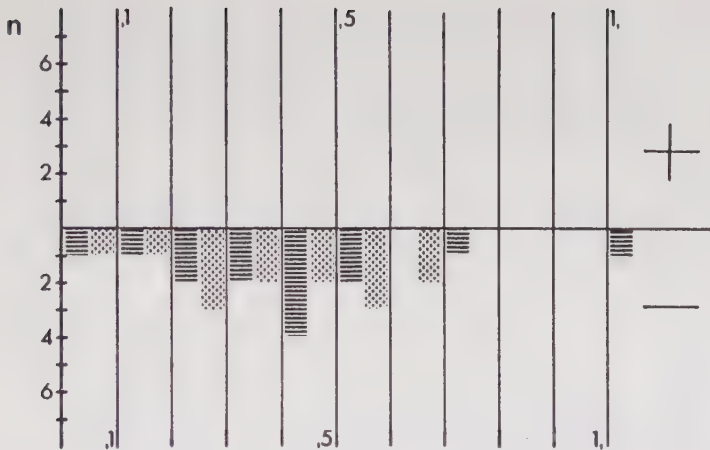


Abb. 38: Differenzen der Stimulationsindices bei kombinierten Stimulationen mit den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 . Als Mitogen wirkte Con A, als Allergen Hausstaubmilbenextrakt. Verteilung der nach Formel VII (S. 98) gefundenen Werte bei 14 Atopikern (gepunktet) und bei 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 98/99.

Wie vorher bedeutet dieses Ergebnis eine abgeschwächte Wirksamkeit der niedrigeren Allergenkonzentration D2; in fast allen Fällen lagen die Werte aus $K_{ConA/D2}$ in der Nähe des Ausgangswertes in K_{ConA} . Eine Ausnahme war ein Ergebnis bei einer Kontrollperson, bei der der Mitogenwert durch D2 um 64 % gesteigert wurde, während bei D1 eine Hemmung um 38 % eingetreten war.

3.2.3.2.9. Differenzen der Stimulationsindices kombinierter Stimulationen bei den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 von Gräserpollen mit dem Mitogen Con A

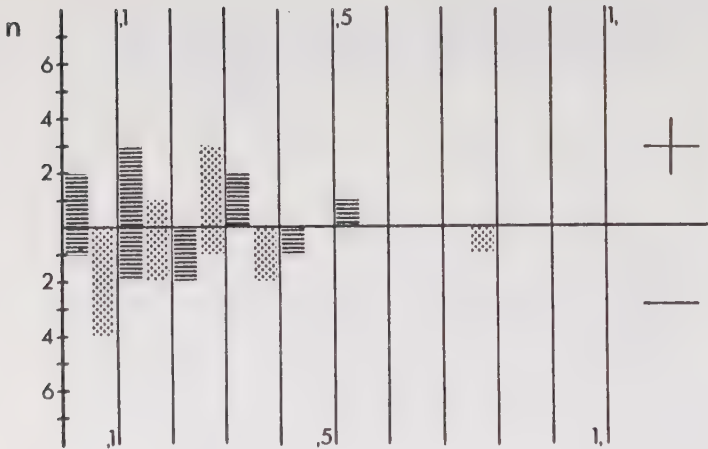


Abb. 39: Differenzen der Stimulationsindices bei kombinierten Stimulationen mit den Allergenkonzentrationen c_1 und c_2 . Als Mitogen wirkte Con A, als Allergen Gräserpollen. Verteilung der nach Formel VII (S. 98) gefundenen Werte bei 14 Atopikern (gepunktet) und bei 14 Kontrollpersonen (schraffiert). Erläuterung zur Graphik s. S. 98/99.

Bei diesen Versuchsansätzen unterschieden sich die Differenzen in den beiden Gruppen insofern, als bei den Atopikern häufiger negative Ergebnisse errechnet wurden (zehn von 14), während bei den Vergleichspersonen die positiven Werte überwogen (acht positiv, sechs negativ). Bei der statistischen Prüfung der Verteilung konnten signifi-

kante Unterschiede nicht nachgewiesen werden.

Bei der Analyse der Indices zeigte sich bei der Patientengruppe wiederum eine Tendenz zur Annäherung an die Ausgangswerte der Mitogenstimulation, bei der Kontrollgruppe dagegen verhielten sich die Kulturen sehr unterschiedlich: Manche zeigten durch G2 schwächere Antworten als durch G1, andere änderten sich kaum.

Zusammenfassung der Ergebnisse bei kombinierten Mitogen/Allergen-Stimulationen:

Im allgemeinen führte der Zusatz von Allergenen zu Mitogen-stimulierten Kulturen zur Hemmung des Thymidineinbaus. Dabei konnten nur wenige Unterschiede zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe ausgemacht werden. Nur im Fall der Stimulation mit Concanavalin A und Katzenepithel (c_1) war die Verteilung statistisch signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Wenn die schwächer konzentrierten Allergenlösungen (c_2) eingesetzt wurden, führte dies meistens zu einer Annäherung der Meßwerte an die Ausgangswerte der reinen Mitogenstimulationen. Beim Einsatz von Katzenepithel (c_2) mit PHA wurde allerdings eine noch stärkere Hemmung beobachtet als durch die höhere Konzentration c_1 .

Jede eingesetzte Mitogen/Allergen-Kombination zeigte ihr eigenes Wirkungsprofil und mußte daher für sich beschrieben und gedeutet werden. Als auffälligstes Allergen erschien Katzenepithel, das einmal Gruppenunterschiede verursachen konnte und ein anderes Mal in der niedrigeren Konzentration stärkere Hemmeffekte aufwies.

Es bestand die Möglichkeit, daß das in den Allergenstammlösungen enthaltene Phenol die Thymidineinbaurate beeinflussen konnte, wenn auch die Wahrscheinlichkeit gering war, da sein Anteil in der Stammlösung nur ca. 0,5 % ausmachte. In unseren Kulturen betrug die Phenolkonzentration maximal 0,00023 %. Unterdessen konnte im Allergologischen Labor der Dermatologischen Klinik der LMU München gezeigt werden, daß Phenol in dieser Konzentration keine Auswirkungen auf die Lymphozytenstimulation hat.

3.2.4. Vergleich spezifischer IgE-Antikörper im Serum der Patienten mit Lymphozytenstimulationen ihrer Zellkulturen

Innerhalb der Patientengruppe wurden zwei Untergruppen gebildet. In die erste Gruppe wurden die Patienten eingeteilt, bei denen für das entsprechende Allergen (Katzenepithel, Hausstaubmilbenextrakt, Gräserpollen) spezifische IgE-Antikörper im Serum nachgewiesen werden konnten (RAST-Klasse 1 bis 4), in die zweite Gruppe jene Patienten, bei denen keine spezifischen IgE-Antikörper gefunden wurden (RAST-Klasse 0). Die Einteilung erfolgte bei jedem Patienten für jedes betrachtete Allergen, so daß ein bestimmter Patient bei dem einen Allergen in die Gruppe 1, bei einem anderen Allergen in die Gruppe 2 verwiesen werden konnte. Untersucht wurden dann immer alle die Kulturansätze, die mit einem bestimmten Allergen inkubiert worden waren.

Beispiel: Bei einem Patienten wurden folgende spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen:

(Nr. 1) k: 0 d: 2 g: 4

Danach erfolgte die Zuteilung bei der Untersuchung des Einflusses von Katzenepithel (K) in

die Gruppe, bei der keine spezifischen IgE-Antikörper im Serum vorlagen.

Bei den beiden anderen Allergenen wurden die Ergebnisse dieses Patienten der Gruppe mit spezifischen IgE-Antikörpern zugewiesen.

Untersucht wurden alle Ansätze von Patienten, in die Allergene eingesetzt worden waren, also sowohl die reinen Allergenkulturen wie die kombinierten Mitogen/Allergen-Kulturen. Wir gingen in der gleichen Weise vor wie bei der Unterscheidung von Patientengruppe und Kontrollgruppe. Es wurden Histogramme entworfen und auf unterschiedliche Verteilung mit Hilfe des Wilcoxon-Testes geprüft.

In keinem Falle konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Untergruppen gefunden werden. Wir verzichteten deshalb auf die gesonderte Wiedergabe dieser Histogramme, die denen der Kapitel 3.2.3.1. und 3.2.3.2. entsprechen.

3.3. In vitro IgE-Sekretion

3.3.1. IgE-Konzentrationen der Zellüberstände und der Zellsuspensionen vor der Kultivierung

Bei allen Probanden wurden nach der Herstellung der Zellkulturen Überstände aus den Zellsuspensionen zurückbehalten und bei $- 80^{\circ} \text{C}$ tiefgefroren, um daraus die IgE-Konzentrationen zum Zeitpunkt 0 zu bestimmen (IgE_0). Diese Größen wurden bei allen Meßwerten aus den Kulturen als schon zu Beginn der Kultivierungsphase in Lösung befindliches IgE subtrahiert, um nur die von den Zellen während der Inkubationsphase abgegebenen Immunglobuline zu erfassen.

Alle als IgE-Werte der Kulturen genannten Werte sind demnach korrigiert nach der Formel

$$\text{VIII) } \text{IgE}_{K'_x} = \text{IgE}_{K^0_x} - \text{IgE}_0$$

mit $\text{IgE}_{K'_x}$: Korrigierte Werte

$\text{IgE}_{K^0_x}$: Meßwerte aus den Kulturüberständen

IgE_0 : Meßwerte aus den Zellüberständen vor Kultivierung.

Von acht Probanden (sechs Atopiker, zwei Kontrollpersonen) wurden zusätzlich die Zellsuspensionen ohne vorhergehende Kultivierung bei $- 80^\circ \text{ C}$ tiefgefroren und nach dem Auftauen die IgE-Konzentrationen in diesen Lösungen bestimmt. Dieser Vorgang (Freeze - Thawing) wurde mehrmals wiederholt in der Absicht, die Zellmembranen der Lymphozyten zu zerstören und auch die intrazellulär gelagerten IgE-Moleküle einer Bestimmung zugänglich zu machen.

Schließlich wurden nach fünfmaligem Einfrieren - Auftauen diese Zellsuspensionen noch sieben Tage unter den beschriebenen Kulturbedingungen inkubiert und danach erneut IgE daraus bestimmt.

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche, wobei es sich bei allen Werten mit Ausnahme von $\text{IgE}_{K^0_0}$ um die reinen Meßwerte ohne Korrektur handelt.

In allen Fällen waren in den Kulturüberständen (K^0_0) mehr IgE nachzuweisen als in den zugehörigen Überständen vor Kultur. Bei einigen Probanden lagen die Unterschiede bei Faktoren zwischen 5 und 15 (Nr. 3, Nr. 4, Nr. 23).

Die IgE-Konzentrationen der Zellsuspensionen vor der Kultur unterschieden sich nicht erheblich von denen der Über-

Pro- band Nr.	IgE _{K'} ₀ (U/ml)	IgE ₀ (U/ml)	IgE ₁ (U/ml)	IgE ₂ (U/ml)	IgE ₃ (U/ml)	IgE ₅ (U/ml)	IgE _{5,I} (U/ml)
3	11,97	0,79	0,83	-	0,65	0,51	0,61
4	2,22	0,28	0,24	-	0,42	0,25	0,35
5	0,94	0,38	0,26	0,37	0,16	0,19	0,20
6	0,21	0,12	0,11	0,10	0,07	0,06	0,17
7	0,87	0,49	0,42	0,52	0,30	0,35	0,46
8	1,23	0,88	0,67	0,72	0,61	0,55	0,52
23	0,15	0,02	0,09	-	0,05	0,11	0,11
30	0,39	0,00	0,16	-	0,12	0,12	0,25

Tab. 16: IgE-Konzentrationen (U/ml) von Zellsuspensionen und von Überständen der Zellkulturen acht verschiedener Probanden (sechs Atopiker, Nr. 3 - 8; zwei Kontrollpersonen).

IgE_{K'} : IgE aus den Überständen der unstimulierten Zellkulturen
 IgE₀ : IgE aus den Überständen der Zellsuspensionen vor Kultur
 IgE₁₋₅ : IgE aus den Zellsuspensionen nach 1-,..., 5-maligem Einfrieren und Auftauen
 IgE_{5,I} : IgE aus den Zellsuspensionen nach fünfmaligem Einfrieren und Auftauen und folgender siebentägiger Kultur

stände vor Kultur; zum größten Teil bestimmten wir Werte, die in der gleichen Größenordnung lagen. Zweimal lagen sie in den Zellsuspensionen niedriger als in den Überständen (Nr. 5, Nr. 8), zweimal waren sie deutlich größer (Nr. 23, Nr. 30).

Durch mehrmaliges Einfrieren und Wiederauftauen konnten wir keinen Anstieg der IgE-Werte feststellen, eher fielen sie bei wiederholter Durchführung des Arbeitsganges ab.

Einen Anstieg gegenüber den Ausgangszellsuspensionen (Werte der Spalte IgE_5) verzeichneten wir, als wir diese nach dem fünften Auftauen sieben Tage lang im Brutschrank inkubierten (Werte der Spalte $\text{IgE}_{5,1}$). Es kam zu relativen Anstiegen, die in zwei Fällen sogar mehr als 100 % betrugen, absolut wurden jedoch selten höhere Werte als in IgE_0 erreicht.

3.3.2. Maximale und minimale in vitro IgE-Werte bei Atopikern und Kontrollpersonen

Der größte und der kleinste IgE-Wert aus allen Kulturüberständen eines jeden Patienten und jeder Kontrollperson wurden aufgelistet, gleichgültig, ob es sich um einen Wert aus einer stimulierten oder einer unstimulierten Kultur handelte. Die beiden Werte wurden einander gegenübergestellt und miteinander verglichen, indem wir den Quotienten aus maximalem durch minimalen Wert bildeten. Alle IgE-Werte sind nach der Formel VIII (S. 114) korrigiert.

Die Tabellen 16 und 17 zeigen, daß in den Zellkulturen der Atopiker erheblich höhere IgE-Konzentrationen gemessen werden konnten als in denen der Kontrollpersonen. Beim statistischen Vergleich mit Hilfe des Wilcoxon-Testes wurden

Nr.	IgE _{max.} (U/ml)	IgE _{min.} (U/ml)	$\frac{\text{IgE}_{\text{max.}}}{\text{IgE}_{\text{min.}}}$	ΔIgE (IgE _{max.} - IgE _{min.})
1	3,42	1,34	2,55	2,08
2	0,36	0,16	2,25	0,20
3	16,83	9,95	1,69	6,88
4	3,64	1,82	2,00	1,82
5	1,01	0,43	2,35	0,58
6	0,39	0,19	2,05	0,20
7	1,22	0,64	1,91	0,58
8	1,38	0,87	1,58	0,51
9	0,71	0,38	1,87	0,33
10	0,62	0,43	1,44	0,19
11	1,22	0,77	1,58	0,55
12	2,83	1,33	2,13	1,50
13	0,44	0,14	3,14	0,30
14	0,50	0,21	2,38	0,29
15	1,18	0,48	2,46	0,70

Tab. 17: Maximale und minimale IgE-Werte und ihre Differenzen (U/ml) in Überständen von Lymphozytenkulturen bei Atopikern. Verhältnis von maximalem zu minimalem in vitro IgE-Wert.

sowohl für die maximalen wie für die minimalen in vitro IgE-Werte hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen beiden Gruppen gefunden.

Die Quotienten aus maximalem durch minimalen IgE-Wert schwankten bei den Patienten zwischen 1,58 und 3,14. Für die Kontrollpersonen konnten sie zum Teil wegen des nicht meßbaren IgEs nicht berechnet werden, zum Teil wurden wegen der sehr niedrigen minimalen IgE-Konzentration sehr hohe Verhältniszahlen bestimmt.

Nr.	IgE _{max.} (U/ml)	IgE _{min.} (U/ml)	$\frac{\text{IgE}_{\text{max.}}}{\text{IgE}_{\text{min.}}}$	ΔIgE (IgE _{max.} - IgE _{min.})
16	0,15	0,00	-	0,15
17	0,00	0,00	-	0,00
18	0,00	0,00	-	0,00
19	0,00	0,00	-	0,00
20	0,15	0,01	15,0	0,14
21	0,07	0,00	-	0,07
22	0,07	0,00	-	0,07
23	0,23	0,01	23,0	0,22
24	0,09	0,01	9,0	0,08
25	0,11	0,00	-	0,11
26	0,44	0,15	2,93	0,29
27	0,12	0,08	1,50	0,04
28	0,15	0,06	2,50	0,09
29	0,31	0,03	10,33	0,28

Tab. 18: Maximale und minimale IgE-Werte und ihre Differenzen (U/ml) in Überständen von Lymphozytenkulturen bei Kontrollpersonen. Verhältnis von maximalem zu minimalem in vitro IgE-Wert.

3.3.3. IgE-Konzentrationen in den Überständen von Lymphozytenkulturen bei Atopikern

3.3.3.1. Verteilung und Korrelation von Plasma-IgE und in vitro IgE bei Atopikern

In Tabelle 19 sind die von uns gemessenen Plasma-IgE-Spiegel der Patienten den in vitro IgE-Werten, die aus den nicht stimulierten Kulturen K₀ gewonnen wurden, gegenübergestellt.

Nr.	Plasma-IgE (U/ml)	log	IgE in K'_0 (U/ml)	log
1	7 900	3,90	1,75	0,24
2	3 600	3,56	0,73	-0,14
3	17 000	4,23	11,97	1,08
4	492	2,69	2,22	0,35
5	3 350	3,53	0,94	-0,03
6	252	2,40	0,21	-0,67
7	4 750	3,68	0,87	-0,06
8	15 200	4,18	1,23	0,09
9	690	2,84	0,67	-0,17
10	608 .	2,78	0,55	-0,26
11	2 100	3,32	0,83	-0,08
12	7 800	3,89	2,83	0,45
13	650	2,81	0,30	-0,52
14	430	2,63	0,35	-0,46
15	1 450	3,16	0,70	-0,15

Tab. 19: Plasma-IgE-Werte und IgE aus den Überständen der nicht stimulierten Lymphozytenkulturen K'_0 bei Patienten mit atopischem Ekzem. Werte auch ausgedrückt in dekadischen Logarithmen (gerundet auf die zweite Zehnerpotenz nach dem Komma). IgE in U/ml.

Die beiden folgenden Abbildungen 40 und 41 zeigen die Verteilungen der Plasma-IgE-Werte und der in vitro IgE-Werte von K'_0 in ihren dekadischen Logarithmen.

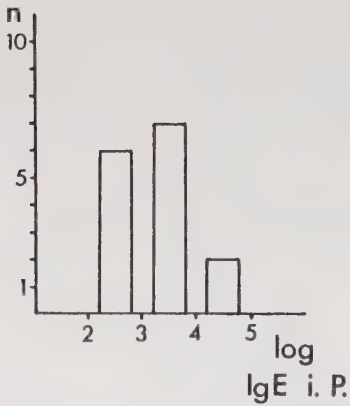


Abb. 40: Verteilung der Plasma-IgE-Spiegel (U/ml) von 15 Atopikern, ausgedrückt als dekadische Logarithmen. Die ganzen Zahlen stellen die unteren Klassengrenzen dar.

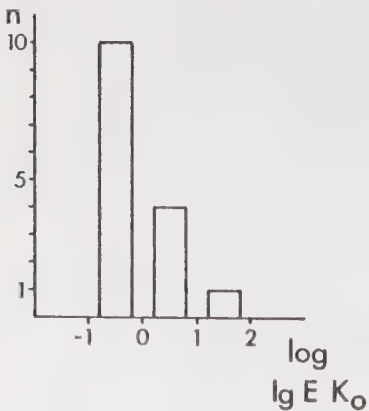


Abb. 41: Verteilung der IgE-Werte aus den Kulturüberständen K'_0 (U/ml) von 15 Atopikern, ausgedrückt als dekadische Logarithmen. Die ganzen Zahlen bilden die unteren Klassengrenzen.

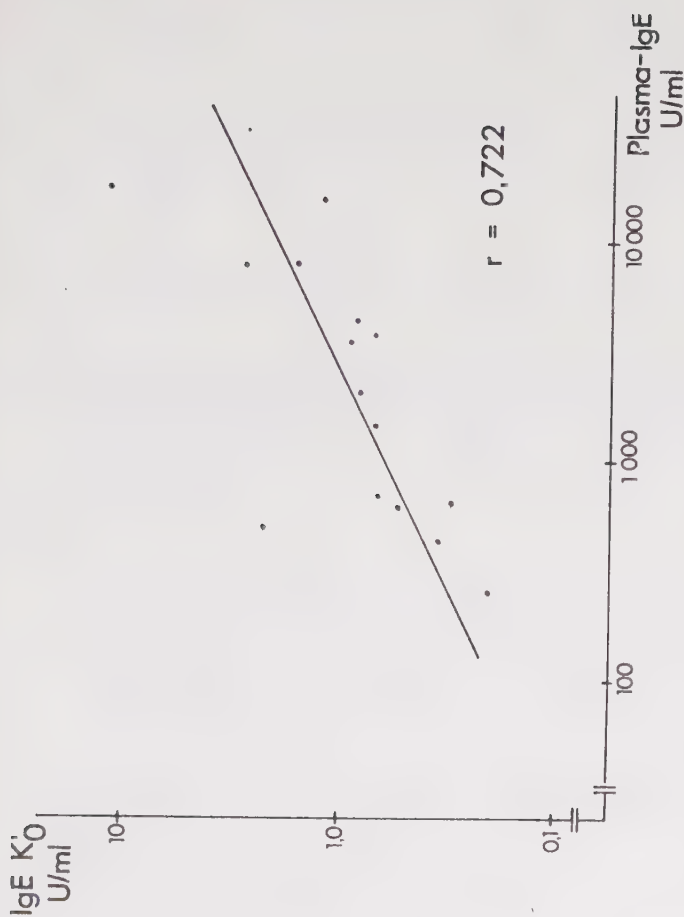


Abb. 42: Korrelation zwischen Plasma-IgE und in vitro IgE der Leerkulturen (K_0) bei 15 Patienten mit atopischem Ekzem. Die Werte sind in doppelt logarithmischem Maßstab aufgetragen. Eingezeichnet ist zusätzlich die Regressionsgerade y .

Die Plasma-IgE-Spiegel und die Werte der Leerkulturen eines jeden Patienten wurden als Koordinaten eines Punktes aufgefaßt und in einem Koordinatensystem mit doppelt logarithmischem Maßstab eingetragen (Abb. 42). Wenn man mit den Logarithmen der Werte eine Regressionsgerade bestimmt, ergibt sich die Geradengleichung

$$y = 0,52x - 1,76;$$

der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,722 ($p < 0,01$).

Das Ergebnis weist auf eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen Plasma-IgE und in vitro IgE bei unseren Versuchen mit den Zellen von Patienten mit atopischem Ekzem hin.

3.3.3.2. IgE-Konzentrationen nach Stimulation mit Mitogenen

Wir stellten die Frage, ob sich durch Mitogenstimulation mit den Mitogenen PWM, PHA und Con A die IgE-Konzentrationen in statistisch signifikanter Weise von den zugehörigen spontanen Sekretionsraten K'_0 unseres Patientenkollektivs unterschieden.

Zur statistischen Auswertung wurde der Vorzeichentest als verteilungsfreier Test bei abhängigen Meßwerten eingesetzt. Dazu wurde der Quotient ($K'_M : K'_0$) gebildet; Werte, die größer als 1 waren, erhielten ein positives Vorzeichen, Werte kleiner 1 ein negatives Vorzeichen, Werte, die gleich 1 waren, wurden nicht berücksichtigt und fielen aus der Zuteilung heraus.

Die Tabellen 20 bis 22 zeigen die Ergebnisse der Versuche auf.

Nr.	K'_0	K'_{PWM}	K'_{PHA}	K'_{ConA}
1	1,75	2,11	3,42	2,88
2	0,36	0,21	0,37	0,16
3	11,97	9,15	16,83	14,33
4	1,92	2,68	3,64	3,00
5	0,94	0,79	0,93	0,55
6	0,21	0,29	0,39	0,12
7	0,87	0,99	1,08	0,75
8	1,23	1,14	0,89	0,95
9	0,67	0,49	0,50	0,49
10	0,55	0,55	0,57	0,62
11	0,83	0,94	0,79	0,85
12	2,83	2,39	2,26	1,56
13	0,30	0,32	0,44	0,15
14	0,35	0,38	0,38	0,50
15	0,70	0,48	0,71	0,68
Σ	25,48	22,91	33,18	27,59
$\bar{x}$	1,70	1,53	2,21	1,84
s	2,93	2,25	4,18	3,57
$s_{\bar{x}}$	0,20	0,15	0,28	0,24

Tab. 20: IgE-Konzentrationen (U/ml) der Überstände aus den Leerkulturen (K'_0) und den mit PWM (K'_{PWM}), PHA (K'_{PHA}), und Con A (K'_{ConA}) stimulierten Kulturen von 15 Atopikern.

Die Tabellen weisen aus, daß die interindividuellen IgE-Werte aus den Kulturüberständen (senkrechte Spalten) in einem weiten Bereich (rund um einen Faktor 100), die intraindividuellen Werte (horizontale Reihen) hingegen nur begrenzt (bis etwa einen maximalen Faktor 3) schwank-

Nr.	$\frac{K'_{PWM}}{K'_0}$	Vor- zeichen	$\frac{K'_{PHA}}{K'_0}$	Vor- zeichen	$\frac{K'_{ConA}}{K'_0}$	Vor- zeichen
1	1,21	+	1,95	+	2,88	+
2	0,58	-	1,03	+	0,44	-
3	0,76	-	1,41	+	1,20	+
4	1,40	+	1,90	+	1,56	+
5	0,84	-	0,99	-	0,59	-
6	1,38	+	1,86	+	0,57	-
7	1,14	+	1,24	+	0,86	-
8	0,93	-	0,72	-	0,77	-
9	0,73	-	0,75	-	0,73	-
10	1,00	n.b.	1,04	+	1,13	+
11	1,13	+	0,95	-	1,02	+
12	0,84	-	0,80	-	0,55	-
13	1,07	+	1,47	+	0,50	-
14	1,09	+	1,09	+	1,43	+
15	0,69	-	1,01	+	0,97	-
$\bar{x}$	0,99		1,21		0,93	
s	0,25		0,42		0,39	
$s_{\bar{x}}$	0,02		0,03		0,03	

Tab. 21: Vielfache der IgE-Konzentrationen in mit Mitogenen (PWM, PHA, Con A) stimulierten Lymphozytenkulturen gegenüber den zugehörigen, nicht stimulierten Leerkulturen (K'_0).
Werte größer 1 wurden mit +, Werte kleiner 1 mit - bewertet, Werte gleich 1 wurden nicht berücksichtigt (n.b.).

ten.

Daraus begründet sich unser Vorgehen, bei jeder Person

	PWM	PHA	Con A
$\bar{x}$	1	10	6
s	1	5	9
n/D	1	6	6
χ^2	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 22: Statistische Auswertung des Vergleichs der IgE-Konzentrationen der mit Mitogenen stimulierten Zellkulturen und der nicht stimulierten Zellkulturen mit dem Vorzeichentest. Die Mitogene benennen die Spalten.

Quotienten zu bilden, wodurch eine Beziehung zu einer Referenzkultur hergestellt wird. Als Referenzkultur bei diesen Versuchen diente die Leerkultur X_0 . Über die Quotienten lassen die IgE-Werte der verschiedenen Versuchspersonen die Frage stellen, ob Zusätze zu Zellkulturen einen positiven oder einen negativen Effekt auf die IgE-Sekretion nehmen, und ob ein solcher Effekt konstant bei allen oder bei einer Mehrzahl von Personen nachweisbar ist.

Nach der statistischen Auswertung ist dies offensichtlich für keines der drei Mitogene der Fall. Bei PWM beobachtet man ebenso viele positive wie negative Ergebnisse. Dies kommt auch im Mittel der Quotienten zum Ausdruck, das von 1 fast nicht verschieden ist. Diese Übereinstimmung zwischen dem Mittelwert der Stimulationsindices (= Quotienten) und dem Testergebnis der qualitativen, statistischen Prüfung stellten wir ebenso für die beiden anderen Mitogene fest. Die Stimulation mit PHA hatte zur Folge, daß bei mehr Atopikern höhere IgE-Werte in diesen Kulturüberständen als in damit verglichenen Leerkulturen X_0 gefunden wurden. Bei Stimulation mit Con A waren sie

bei einer Mehrzahl von Atopikern niedriger.

Statistisch signifikante Steigerungen oder Hemmungen konnten aber bei keinem der drei Mitogene nachgewiesen werden.

3.3.3.3. IgE-Konzentrationen nach Stimulation mit Allergenen

In gleicher Weise wie die mit Mitogenen stimulierten Kulturen wurden die mit Allergenen versetzten Kulturen behandelt. In Tabellen wurden die IgE-Konzentrationen für jeden Patienten und jedes Allergen aufgelistet. Wir untersuchten nur die IgE-Spiegel der Kulturüberstände, die mit den Allergenkonzentrationen A1 (Verdünnung 1:10 der Stammlösungen) inkubiert worden waren. Wir hatten zuvor bei einigen Versuchspersonen beobachtet, daß andere Konzentrationen der Allergene die IgE-Sekretion nur unwesentlich beeinträchtigten oder förderten.

Die Auswertung der Ergebnisse wurde in der gleichen Form ausgeführt wie die der Mitogenstimulationen. Wir bildeten wiederum Quotienten der IgE-Werte in den stimulierten Kulturen dividiert durch die der nicht stimulierten Leerkulturen K_0 und bewerteten sie nach der oben genannten Vorschrift für den Vorzeichentest.

Die Ergebnisse der Versuche mit Allergenen sind in den Tabellen 23 bis 25 aufgeführt.

Nr.	K'_0	K'_K	K'_D	K'_G	Serum-RAST		
					k	d	g
1	1,75	1,25	2,15	1,33	0	2	4
2	0,36	0,28	0,24	0,18	3	2	4
3	11,97	10,73	13,45	15,89	3	3	4
4	1,92	2,14	1,82	2,37	0	0	0
5	0,94	0,97	0,62	0,73	0	2	0
6	0,21	0,06	0,17	0,19	0	0	0
7	0,87	1,18	0,92	0,93	0	4	4
8	1,23	1,01	1,03	1,38	3	2	1
9	0,67	0,46	0,71	0,58	0	0	0
10	0,55	0,53	0,57	0,45	0	4	4
11	0,83	0,77	0,92	1,22	4	2	3
12	2,83	2,48	2,64	2,22	0	1	3
13	0,30	0,24	0,21	0,33	0	0	0
14	0,35	0,38	0,21	0,33	0	0	1
15	0,70	0,69	1,03	1,18	3	0	0
Σ	25,48	23,17	26,69	29,40			
$\bar{x}$	1,70	1,54	1,78	1,96			
s	2,93	2,63	3,31	3,91			
$s_{\bar{x}}$	0,20	0,18	0,22	0,26			

Tab. 23: IgE-Konzentrationen (U/ml) der Überstände aus den Leerkulturen (K'_0) und den mit Katzenepithel (K'_K), Hausstaubmilbe (K'_D) und Gräserpollen (K'_G) stimulierten Kulturen. Zum Vergleich sind die RAST-Klassen der spezifischen IgE-Antikörper im Serum der Patienten gegen die betreffenden Allergene angegeben (k = Katzenepithel, d = Hausstaubmilbe, g = Gräserpollen).

Nr.	$\frac{K'_K}{K'_0}$	Vor- zeichen	$\frac{K'_D}{K'_0}$	Vor- zeichen	$\frac{K'_G}{K'_0}$	Vor- zeichen
1	0,59	-	1,02	+	0,63	-
2	1,33	+	1,14	+	0,86	-
3	1,17	+	1,50	+	1,74	+
4	0,80	-	0,68	-	0,88	-
5	1,23	+	0,78	-	1,00	n.b.
6	0,21	-	0,59	-	0,66	-
7	1,19	+	0,93	-	0,94	-
8	0,89	-	0,90	-	1,21	+
9	0,94	-	1,45	+	1,18	+
10	0,96	-	1,04	+	0,82	-
11	0,82	-	0,98	-	1,30	+
12	1,04	+	1,10	+	0,93	-
13	0,75	-	0,66	-	1,31	+
14	1,00	n.b.	0,55	-	0,87	-
15	1,44	+	2,15	+	2,46	+
$\bar{x}$	0,96		1,03		1,12	
s	0,31		0,42		0,47	
$s_{\bar{x}}$	0,02		0,03		0,03	

Tab. 24: Vielfache der IgE-Konzentrationen in mit Allergenen (Katzenepithel K, Hausstaubmilbe D, Gräserpollen G) stimulierten Lymphozytenkulturen gegenüber den zugehörigen, nicht stimulierten Leerkulturen (K_0).

Werte größer 1 wurden mit +, Werte kleiner 1 mit - bewertet, Werte gleich 1 wurden nicht berücksichtigt (n.b.).

Wie wir schon bei den mit Mitogenen stimulierten Kulturen beobachteten, ändern sich die Werte der Kulturüberstände

	K	D	G
+	6	7	6
-	8	8	8
n.b.	1	0	1
p	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 25: Statistische Auswertung des Vergleichs der IgE-Konzentrationen der mit Allergenen stimulierten Zellkulturen und der nicht stimulierten Zellkulturen mit dem Vorzeichentest. Die Allergene benennen die Spalten.

eines Patienten nach Inkubation mit Allergenen in nur geringem Umfange. Weitaus bedeutender sind auch hier die Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten.

Wie im Zusammenhang mit der Mitogenstimulation fanden wir bei der Untersuchung der Stimulationsindices (= Quotienten) keine positive oder negative Beeinflussung der IgE-Sekretion durch Allergene, wenn die gesamte Atopikergruppe in die Betrachtung mit einbezogen wurde. Die Mittelwerte der Quotienten waren minimal von 1 verschieden, es hatten immer etwa gleich viele Patienten positive wie negative Ergebnisse.

Nur wenige Atopiker zeigten nach der Provokation ihrer Lymphozytenkulturen mit verschiedenen Allergenen gleichsinnige Änderungen (nur positive Nr. 4 und Nr. 15, nur negative Nr. 5). Alle anderen erhielten entweder zweimal ein positives Zeichen (Steigerung der spontanen IgE-Sekretion unter dem Einfluß eines Allergens) und ein negatives (Hemmung der spontanen IgE-Sekretion) bzw. umge-

kehrt.

3.3.3.4. IgE-Konzentrationen nach kombinierter Stimulation mit Mitogenen und Allergenen

Wir untersuchten, ob Allergene einen Einfluß - ob fördernd oder hemmend - auf die IgE-Sekretion in den Mitogen-stimulierten Kulturen ausübten. Es wurden die IgE-Konzentrationen in den Überständen der Kulturen bestimmt, die mit den Mitogenen PWM, PHA und Con A und den Allergenen Katzenepithel (K), Hausstaubmilbe (Dermatophagoides pteronyssinus) (D) und Gräserpollen (G) stimuliert worden waren. Die Allergene waren in den Verdünnungen A1 (1:10 der Stammlösungen) eingesetzt.

Bei der Auswertung verfahren wir in gleicher Weise wie in den Kapiteln 3.3.3.2. und 3.3.3.3. In tabellarischer Form wurden die korrigierten Meßwerte für die Mitogenkulturen und die Mitogen/Allergen-Kulturen aufgeführt. Aus diesen Meßwerten berechneten wir die Quotienten ($K_{M/A}^i : K_M^i$). Als Referenzkulturen wurden also bei diesen Versuchen die jeweiligen Mitogenkulturen herangezogen. Auch diese Quotienten wurden tabelliert und nach der Vorschrift aus Kapitel 3.3.3.2. für den Vorzeichen-test bewertet.

In einer statistischen Tabelle wurden schließlich die Auswertungen für die einzelnen Mitogene zusammengefaßt.

3.3.3.4.1. Stimulation mit Pokeweed Mitogen und Allergenen

Nr.	K _{PWM} ^I	K _{PWM/K} ^I	K _{PWM/D} ^I	K _{PWM/G} ^I
1	2,11	1,34	1,51	2,26
2	0,21	0,23	0,21	0,25
3	9,15	11,05	11,13	10,79
4	2,68	2,60	2,38	2,47
5	0,79	0,70	0,84	0,57
6	0,29	0,28	0,21	0,22
7	0,99	0,67	0,84	0,64
8	1,14	0,92	0,88	1,06
9	0,49	0,43	0,57	0,43
10	0,55	0,47	0,57	0,43
11	0,94	0,81	0,80	0,89
12	2,39	1,34	1,34	1,33
13	0,32	0,21	0,21	0,21
14	0,38	0,35	0,31	0,51
15	0,48	0,67	0,66	0,85
Σ	22,91	22,05	22,50	22,95
$\bar{x}$	1,53	1,47	1,50	1,53
s	2,25	2,72	2,73	2,65
$s_{\bar{x}}$	0,15	0,18	0,18	0,18

Tab. 26: IgE-Konzentrationen (U/ml) der Überstände aus den PWM-Kulturen und den mit dem Mitogen und den Allergenen Katzenepithel (PWM/K), Hausstaubmilbe (PWM/D) und Gräserpollen (PWM/G) stimulierten Kulturen.

Nr.	$\frac{K'_{PWM/K}}{K'_{PWM}}$	Vor- zeichen	$\frac{K'_{PWM/D}}{K'_{PWM}}$	Vor- zeichen	$\frac{K'_{PWM/G}}{K'_{PWM}}$	Vor- zeichen
1	0,64	-	0,72	-	1,07	+
2	1,10	+	1,00	n.b.	1,19	+
3	1,21	+	1,22	+	1,18	+
4	0,97	-	0,89	-	0,92	-
5	0,89	-	1,06	+	0,92	-
6	0,97	-	0,72	-	0,76	-
7	0,68	-	0,85	-	0,65	-
8	0,81	-	0,77	-	0,93	-
9	0,88	-	1,16	+	0,98	-
10	0,85	-	1,04	+	0,78	-
11	0,86	-	0,85	-	0,95	-
12	0,56	-	0,56	-	0,56	-
13	0,66	-	0,66	-	0,66	-
14	0,92	-	0,82	-	1,34	+
15	1,40	+	1,38	+	1,77	+
$\bar{x}$	0,89		0,91		0,96	
s	0,22		0,23		0,32	
$s_{\bar{x}}$	0,01		0,02		0,02	

Tab. 27: Vielfache der IgE-Konzentrationen in mit PWM und Allergenen (Katzenepithel K, Hausstaubmilbe D, Gräserpollen G) stimulierten Lymphozytenkulturen gegenüber den zugehörigen, mit PWM alleine stimulierten Kulturen.

Werte größer 1 wurden mit +, Werte kleiner 1 mit - bewertet, Werte gleich 1 wurden nicht berücksichtigt (n.b.).

	PWM/K	PWM/D	PWM/G
+	3	5	5
-	12	9	10
n.b.	0	1	0
p	< 0,05	n.s.	n.s.

Tab. 28: Statistische Auswertung des Vergleichs der IgE-Konzentrationen der mit PWM/Allergen-stimulierten Zellkulturen und der allein mit PWM stimulierten Kulturen mit dem Vorzeichentest. Die Spaltenbenennung erfolgte nach dem Stimulationsansatz.

Die Tabellen lassen erkennen, daß der Zusatz von Allergenen zum Mitogen häufiger zu einer Abnahme als zu einer Zunahme der IgE-Spiegel im Vergleich zur einfachen PWM-Stimulation führte. Dies gilt für alle drei verwendeten Allergene, ein statistisch signifikantes Ergebnis allerdings zeigte sich nur beim Einsatz von Katzenepithel.

3.3.3.4.2. Stimulation mit Phytohämagglutinin und Allergenen

Nr.	K'_{PHA}	$K'_{PHA/K}$	$K'_{PHA/D}$	$K'_{PHA/G}$
1	3,42	2,37	3,18	2,55
2	0,37	0,16	0,27	0,30
3	16,83	10,79	12,81	9,95
4	3,64	3,19	3,14	2,69
5	0,93	1,01	0,81	0,58
6	0,39	0,17	0,21	0,08
7	1,08	0,90	1,07	1,02
8	0,89	0,87	0,92	0,92
9	0,50	0,43	0,52	0,41
10	0,57	0,52	0,59	0,55
11	0,79	0,92	0,87	0,80
12	2,26	1,80	1,84	2,41
13	0,44	0,26	0,19	0,14
14	0,38	0,31	0,42	0,29
15	0,71	0,71	0,83	0,77
Σ	33,18	24,41	27,67	23,36
$\bar{x}$	2,21	1,63	1,84	1,56
s	4,18	2,68	3,18	2,48
$s_{\bar{x}}$	0,28	0,18	0,21	0,17

Tab. 29: IgE-Konzentrationen (U/ml) der Überstände aus den PHA-Kulturen und den mit dem Mitogen und den Allergenen Katzenepithel (PHA/K), Hausstaubmilbe (PHA/D) und Gräserpollen (PHA/G) stimulierten Kulturen.

Nr.	$\frac{K'_{PHA/K}}{K'_{PHA}}$	Vor- zeichen	$\frac{K'_{PHA/D}}{K'_{PHA}}$	Vor- zeichen	$\frac{K'_{PHA/G}}{K'_{PHA}}$	Vor- zeichen
1	0,69	-	0,93	-	0,75	-
2	0,43	-	0,73	-	0,81	-
3	0,64	-	0,76	-	0,59	-
4	0,88	-	0,86	-	0,71	-
5	1,09	+	0,87	-	0,62	-
6	0,44	-	0,54	-	0,21	-
7	0,83	-	0,99	-	0,94	-
8	0,98	-	1,03	+	1,03	+
9	0,86	-	1,04	+	0,82	-
10	0,91	-	1,04	+	0,96	-
11	1,16	+	1,10	+	1,01	+
12	0,80	-	0,81	-	1,07	+
13	0,59	-	0,43	-	0,32	-
14	0,82	-	1,11	+	0,76	-
15	1,00	n.b.	1,17	+	1,08	+
$\bar{x}$	0,81		0,89		0,78	
s	0,22		0,21		0,26	
$s_{\bar{x}}$	0,01		0,01		0,02	

Tab. 30: Vielfache der IgE-Konzentrationen in mit PHA und Allergenen (Katzenepithel K, Hausstaubmilbe D, Gräserpollen G) stimulierten Lymphozytenkulturen gegenüber den zugehörigen, mit PHA alleine stimulierten Kulturen.

Werte größer 1 wurden mit +, Werte kleiner 1 mit - bewertet, Werte gleich 1 wurden nicht berücksichtigt (n.b.).

	PHA/K	PHA/D	PHA/G
+	2	6	4
-	12	9	11
n.b.	1	0	0
p	< 0,05	n.s.	n.s.

Tab. 31: Statistische Auswertung des Vergleichs der IgE-Konzentrationen der mit PHA/Allergen-stimulierten Zellkulturen und der allein mit PHA stimulierten Kulturen mit dem Vorzeichentest. Die Spaltenbenennung erfolgte nach dem Stimulationsansatz.

Genauso wie bei PWM beeinträchtigten die Allergene die IgE-Sekretion der PHA-stimulierten Kulturen. Und ebenso wie bei PWM erwies sich Katzenepithel als besonders wirksam und hatte ein statistisch signifikantes Ergebnis zur Folge. Auch Hausstaubmilbe und Gräserpollen wirkten eher hemmend als fördernd, das letztere ausgeprägter als das erste.

3.3.3.4.3. Stimulation mit Concanavalin A und Allergenen

Nr.	K'ConA	K'ConA/K	K'ConA/D	K'ConA/G
1	2,88	2,13	1,83	2,19
2	0,16	0,16	0,36	0,25
3	14,33	13,29	12,69	11,45
4	3,00	2,93	2,74	2,63
5	0,55	0,68	0,75	0,53
6	0,12	0,22	0,04	0,14
7	0,75	1,00	1,22	0,95
8	0,95	1,14	0,94	0,95
9	0,49	0,38	0,47	0,46
10	0,62	0,50	0,60	0,61
11	0,85	0,78	0,91	1,20
12	1,56	1,84	2,73	2,13
13	0,15	0,18	0,18	0,15
14	0,50	0,50	0,40	0,34
15	0,68	1,14	0,77	0,49
Σ	27,59	26,87	26,63	24,47
$\bar{x}$	1,84	1,79	1,78	1,63
s	3,57	3,28	3,13	2,83
$s_{\bar{x}}$	0,24	0,22	0,21	0,19

Tab. 32: IgE-Konzentrationen (U/ml) der Überstände aus den Con A-Kulturen und den mit dem Mitogen und den Allergenen Katzenepithel (ConA/K), Hausstaubmilbe (ConA/D) und Gräserpollen (ConA/G) stimulierten Kulturen.

α	$\frac{K_{\text{Zinn(II)}}}{K_{\text{Zinn(IV)}}$	vor- zeichen	$\frac{K_{\text{Zinn(II)}}}{K_{\text{Zinn(IV)}}$	vor- zeichen	$\frac{K_{\text{Zinn(II)}}}{K_{\text{Zinn(IV)}}$	vor- zeichen
1	0,74	-	0,24	-	0,74	-
2	1,00	0,2	0,29	+	1,79	+
3	2,99	-	0,99	-	0,99	-
4	0,99	-	0,99	-	0,99	-
5	1,04	+	1,96	+	0,96	-
6	1,96	+	0,96	-	1,97	+
7	1,99	+	1,99	+	1,01	-
8	1,00	+	0,99	-	1,00	0,2
9	0,76	-	0,96	-	0,94	-
10	0,97	-	0,97	-	0,96	-
11	0,97	-	1,07	+	1,40	+
12	1,15	+	1,79	+	1,71	+
13	1,00	-	1,00	-	1,00	0,2
14	1,00	0,2	0,90	-	0,98	-
15	1,99	+	1,99	+	0,70	-
Σ	1,12		1,13		0,91	
$\bar{\alpha}$	0,74		1,41		0,21	
σ_{α}	0,71		0,23		0,10	

Tab. 15: Verläufe der α -Konzentrationen im Maß α und α -Äquivalent (kalometrisch K_1 Maßstabsverhältnis, Größenzahlen α = stöchiometrisches Äquivalenzverhältnis Zinn(II) zu Zinn(IV), Maß α = Äquivalent stöchiometrisches Verhältnis).

Werte α und α -Äquivalent mit α -Äquivalent α mit α -Äquivalent, Werte α und α -Äquivalent mit α -Äquivalent α mit α -Äquivalent.

	ConA/K	ConA/D	ConA/G
+	7	7	5
-	6	8	8
n.b.	2	0	2
p	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 34: Statistische Auswertung des Vergleichs der IgE-Konzentrationen der mit Con A/Allergen-stimulierten Zellkulturen und der allein mit Con A stimulierten Kulturen mit dem Vorzeichentest. Die Spaltenbenennung erfolgte nach dem Stimulationsansatz.

Nach der Stimulation der Zellkulturen mit Allergenen und Con A zeigte sich im Gegensatz zu den Mitogenen PHA und PWM ein eher ausgeglichenes Bild. Bei annähernd gleich vielen Personen wurde eine Hemmung der IgE-Sekretion wie eine Steigerung beobachtet.

Zusammenfassung:

Statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden nur für die Kombinationen PWM/K und PHA/K gefunden. In beiden Fällen wurden beim Einsatz von Mitogen und Allergen häufiger niedrigere IgE-Werte bestimmt als beim Einsatz von Mitogen allein. Bei Con A konnte dieser Effekt nicht gefunden werden.

Die anderen Allergene Hausstaubmilbe und Gräserpollen führten in keinem Fall zu signifikanten Unterschieden, wenn sie in Kombination mit Mitogenen eingesetzt wurden. Allerdings zeigte sich in allen Fällen die Tendenz der negativen Be-

einflussung der Mitogenwerte durch Allergene. Die Summe der negativ bewerteten Fälle bei allen Mitogen/Allergen-Kulturen betrug 85 gegenüber 44 positiv bewerteten. Dieses Bild bestätigte sich auch bei der Betrachtung der Mittelwerte der Stimulationsindices, die bei allen PWM/Allergen-Kulturen und PHA/Allergen-Kulturen kleiner als 1 waren. (IgE war im Durchschnitt also in den mit den Mitogenen PWM bzw. PHA und Allergenen stimulierten Kulturen niedriger als in den mit PWM bzw. PHA alleine stimulierten.)

In den meisten Fällen waren die IgE-Konzentrationen durch unterschiedliche Ansätze nur wenig zu beeinflussen. Die Größenordnungen, in denen die IgE-Konzentrationen gemessen werden konnten, waren durch die Lymphozytenpopulationen vorgegeben, d. h. daß zwischen den einzelnen Patienten erhebliche Unterschiede bei denselben Kulturansätzen gesehen werden konnten, aber bei der Betrachtung verschiedener Ansätze desselben Patienten nur geringe.

3.3.3.5. Vergleich spezifischer IgE-Antikörper im Serum mit der in vitro IgE-Sekretion nach Allergenstimulation

Genauso wie bei der Untersuchung des Einflusses spezifischer IgE-Antikörper auf den Lymphozytentransformationstest bildeten wir innerhalb der Patientengruppe zwei Untergruppen, je nachdem, ob für ein bestimmtes Allergen spezifische IgE-Antikörper im Serum des Patienten gefunden werden konnten oder nicht. Wir stellten dann an alle Ergebnisse aus den Kulturen, die mit den Allergenen stimuliert worden waren, die Frage, ob Lymphozyten von RAST-positiven Patienten im Vergleich zu denen RAST-negativer Patienten vermehrt oder vermindert IgE sezernieren.

Die Auswertung wurde nach den Bewertungen der Tabellen 24 (S. 128), 27 (S. 132), 30 (S. 135) und 33 (S. 138) durchgeführt. Wir ordneten für jedes Allergen getrennt die Patienten der RAST-X-Gruppe zu, wenn in ihrem Serum die RAST-Klassen 1 bis 4 gemessen wurden, der RAST-O-Gruppe, wenn die RAST-Klasse 0 bestimmt wurde (Vgl. Tab. 23, S. 127).

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Stimulation mit Katzenepithel und spezifischen IgE-Antikörpern gegen Katzenepithel im Serum der Atopiker gelangten also fünf Patienten in die RAST-X-Gruppe, zehn in die RAST-O-Gruppe. Entsprechend befanden sich bei der Betrachtung der Effekte von Hausstaubmilbe und Gräserpollen je neun Personen in der RAST-X-Gruppe, sechs in der RAST-O-Gruppe. In jeder Untergruppe wurden anschließend die positiven und die negativen Zeichen summiert.

	K		PWM/K		PWM/D		PWM/G	
	+	-	+	-	+	-	+	-
RAST-X	3	2	3	2	1	4	2	3
RAST-O	3	6	0	10	1	9	5	3
Summe	6	8	3	12	2	13	7	6

Tab. 35: Steigerungen (+) und Hemmungen (-) der mit Katzenepithel stimulierten Kulturen gegenüber den Referenzkulturen ohne Allergenzusatz, aufgeschlüsselt nach Patienten mit (Gruppe RAST-X) und ohne (Gruppe RAST-O) spezifische IgE-Antikörper gegen Katzenepithel im Serum (Vgl. Bewertungen der Tabellen 24, 27, 30 und 33).

	D		PWM/D		PHA/D		ConA/D	
	+	-	+	-	+	-	+	-
RAST-X	5	4	3	6	3	6	5	4
RAST-O	2	4	2	4	3	3	4	3
Summe	7	8	5	10	6	9	9	7

Tab. 36: Steigerungen (+) und Hemmungen (-) der mit Hausstaubmilbe stimulierten Kulturen gegenüber den Referenzkulturen ohne Allergenzusatz, aufgeschlüsselt nach Patienten mit (Gruppe RAST-X) und ohne (Gruppe RAST-O) spezifische IgE-Antikörpern gegen Hausstaubmilbe im Serum (Vgl. Bewertungen der Tabellen 24, 27, 30 und 33).

	G		PWM/G		PHA/G		ConA/G	
	+	-	+	-	+	-	+	-
RAST-X	3	6	4	5	3	6	4	5
RAST-O	3	2	1	5	1	5	1	3
Summe	6	8	5	10	4	11	5	8

Tab. 37: Steigerungen (+) und Hemmungen (-) der mit Gräserpollenextrakt stimulierten Kulturen gegenüber den Referenzkulturen ohne Allergenzusatz, aufgeschlüsselt nach Patienten mit (Gruppe RAST-X) und ohne (Gruppe RAST-O) spezifische IgE-Antikörper gegen Gräserpollen im Serum (Vgl. Bewertungen der Tabellen 24, 27, 30 und 33).

Es erwies sich, daß insbesondere bei der Betrachtung der Allergene Hausstaubmilbe (D) und Gräserpollenextrakt (G) positive und negative Effekte annähernd ausgeglichen sind, wenn auch in manchen Ansätzen die eine oder die andere Gruppe bevorzugt von negativen Effekten betroffen scheint. Beim Allergen Katzenepithel (K) sind

die Lymphozytenkulturen von Atopikern mit RAST-Klasse 0 im Serum häufiger hemmenden Wirkungen unterworfen. Eine Ausnahme bildet der Ansatz mit Con A und Katzenepithel, bei dem in dieser Untergruppe verstärkte IgE-Sekretionen festzustellen waren.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden in diesen Untersuchungen nicht beobachtet.

3.4. Nachweis spezifischer IgE-Antikörper in den Überständen von Lymphozytenkulturen

Wir versuchten, aus Kulturüberständen von zehn Atopikern, in denen zuvor IgE unterschiedlich hoher Konzentrationen bestimmt worden waren, spezifische IgE-Antikörper mit dem RAST nachzuweisen.

Von allen zehn Patienten wurden die Überstände der Leerkulturen (K'_0) und der mit Gräserpollenextrakt stimulierten Kulturen (K'_G) für den Nachweis herangezogen. In beiden Kulturansätzen wurde nach spezifischen IgE-Antikörpern gegen Gräserpollen (g) und gegen Hausstaubmilbe (d) gesucht.

Es wurden zwei Gruppen gebildet mit jeweils fünf Patienten. Die erste Gruppe wurde besetzt mit den Atopikern, in deren Serum die RAST-Klasse 4 gegen Gräserpollen gefunden worden war (Nr. 1, 2, 3, 7, 10), die zweite mit Atopikern, die die RAST-Klasse 0 aufwiesen (Nr. 4, 5, 6, 9, 15).

Bei der Bestimmung der RAST-Klassen in den Überständen führten wir zusätzlich einen Nullwert ein, der sich aus der Messung des IgE-freien Verdünners ergab. Bei der Bewertung der Ergebnisse wurden danach folgende Bezeichnung-

gen gewählt:

1 bis 4: RAST-Klasse 1 bis 4

< 1: RAST-Klasse < 1, Zählrate größer als
der Nullwert und kleiner 1

0: RAST-Klasse 0, Zählrate gleich oder
kleiner als der Nullwert

Nr.	K_0^I		K_G^I		Serum-RAST	
	g	d	g	d	g	d
1	< 1	0	< 1	0	4	2
2	< 1	0	< 1	0	4	2
3	< 1	2	< 1	2	4	3
7	< 1	0	< 1	0	4	4
10	< 1	< 1	< 1	< 1	4	4

Tab. 38: Spezifische IgE-Antikörper gegen Gräserpollen
(g) und Hausstaubmilbe (d) in den Leerkul-
turen (K_0^I) und den mit Gräserpollenextrakt
stimulierten Kulturen (K_G^I) bei Atopikern mit
Serum-RAST-Klasse 4 gegen Gräserpollen

Nr.	K_0^I		K_G^I		Serum-RAST	
	g	d	g	d	g	d
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
7	< 1	0	< 1	0	0	0
15	< 1	0	< 1	0	0	0

Tab. 39: Spezifische IgE-Antikörper gegen Gräserpollen
(g) und Hausstaubmilbe (d) in den Leerkul-
turen (K_0^I) und den mit Gräserpollenextrakt
stimulierten Kulturen (K_G^I) bei Atopikern mit
Serum-RAST-Klasse 0 gegen Gräserpollen

Die Berechtigung, den Wert < 1 einzuführen, leiteten wir daraus ab, daß Counts auftraten, die nicht mehr in die RAST-Klasse 1 fielen, die aber größer waren als die Zählraten, die der IgE-freie Verdünner lieferte. Im allgemeinen werden diese Ergebnisse in die RAST-Klasse 0 eingeordnet. Theoretisch besteht jedoch die Möglichkeit, daß auch vom Wert < 1 spezifische IgE-Antikörper erfaßt werden, da der Grenzwert des gebräuchlichen RAST zwischen der RAST-Klasse 0 und der RAST-Klasse 1 durch den Standard einer 1:50-Verdünnung eines Referenzserums festgelegt wird. Niedrigere Konzentrationen fallen demnach bei der herkömmlichen Auswertung in die RAST-Klasse 0.

Da die RAST-Klassen einen sehr groben Maßstab mit nur fünf Einheiten (Klassen 0 bis 4) darstellen und wir an unsere Testergebnisse die Frage stellten, ob Zellkulturen sich durch Inkubation mit Allergenen zu einer verstärkten Sekretion von spezifischen IgE-Antikörpern anregen ließen, versuchten wir eine qualitative Auswertung anhand der Zählraten. Es wurde gefordert, daß für eine positive Beantwortung dieser Frage die Zählraten im Überstand der mit Gräserpollen stimulierten Kultur (K_G^I) größer sein mußten als in der Leerkultur (K_O^I), und daß sie in K_G^I mindestens in die RAST-Klasse < 1 fallen mußten. Die Differenz der Zählraten ($C K_G^I - C K_O^I$) mußte außerdem größer sein als 20 % des Mittelwertes dieser beiden Werte. Die Grenze von 20 % wurde willkürlich gewählt; nach unseren Erfahrungen bei der Durchführung des RAST gestattet sie eine einigermaßen zuverlässige Unterscheidung zweier unterschiedlicher Werte.

Auf Grund dieser Forderungen stellten wir Zuordnungsvorschriften für eine positive und für eine negative Antwort auf unsere Frage auf, ob Allergene bei unseren Zellkulturen zu einer vermehrten Sekretion von spezifischen

IgE-Antikörpern führten.

Die Zuordnungsvorschriften lauteten:

+	$C K'_G \geq 0, \quad \frac{C K'_G - C K'_0}{\frac{1}{2} (C K'_G + C K'_0)} > 0,2;$
-	1. $C K'_G < 0, \quad C K'_0 < 0;$ 2. $C K'_G < C K'_0;$ 3. $C K'_G \geq 0, \quad \frac{C K'_G - C K'_0}{\frac{1}{2} (C K'_G + C K'_0)} \leq 0,2;$

C bezeichnet die Zählwerte (Counts) in den jeweiligen Kulturüberständen.

Nach Gruppe I und Gruppe II getrennt ergab sich daraus folgendes Ergebnis:

Gruppe I

Nr.	g	d
1	-	-
2	-	-
3	-	-
7	+	-
10	+	-

Gruppe II

Nr.	g	d
4	-	-
5	+	-
6	+	+
9	-	-
15	-	-

Tab. 40: Qualitative Auswertung nach obiger Vorschrift der RAST-Ergebnisse in den Kulturüberständen bei Ato-pikern mit RAST-Klasse 4 (Gruppe I) und RAST-Klasse 0 (Gruppe II) im Serum gegen Gräserpollen.

In vier von zehn Fällen konnte eine Zunahme der IgE-Antikörper gegen Gras in den mit Gräserpollen stimulierten Kulturen vermutet werden, in sechs Fällen war das Ergebnis negativ. Zweimal trat dieses Ereignis bei Patienten der Gruppe II auf, bei denen im Serum die RAST-Klasse 0 gegen Gräserpollen bestimmt worden war. Betrachtet man die IgE-Antikörper gegen Hausstaubmilbe in den mit Gräserpollenextrakt stimulierten Kulturen, so waren deren Zählraten in nur einem Fall gegenüber der Leerkultur erhöht.

Es gelang uns demnach nicht, durch Inkubation mit Allergenen die Zellkulturen dazu zu veranlassen, eindeutig meßbar vermehrt spezifische IgE-Antikörper in das Medium abzugeben. Auch ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten Sekretion spezifischer IgE-Antikörper und dem Vorhandensein spezifischer IgE-Antikörper im Serum der Patienten konnte nicht aufgezeigt werden.

DISKUSSION

In den vorgestellten Versuchen untersuchten wir die Zellproliferation und IgE-Sekretion in Lymphozytenkulturen nach Stimulation mit spezifischen (Allergene) und unspezifischen (Mitogene) Reizen.

In Vorarbeiten zur Methodik wurden Versuche zur Kinetik des LTT und der in vitro IgE-Sekretion ausgeführt. Während die Zählraten beim LTT ein Maximum am vierten Tag zeigten und danach abfielen, konnte IgE am besten nach sieben Tagen gemessen werden. Verschiedene Methoden der IgE-Bestimmung (verschiedene Modifikationen des PRIST und eines Enzymimmunoassays) wurden verglichen und wertend gegenübergestellt. Auf Grund unserer Arbeiten entschieden wir uns dafür, für unsere IgE-Messungen einen modifizierten PRIST anzuwenden, bei dem die Inkubationen jeweils 24 Stunden dauerten und bei Raumtemperatur ausgeführt werden konnten.

Im Lymphozytentransformationstest (LTT), bei dem die ^3H -Thymidineinbaurate bestimmt wird, verglichen wir die Ergebnisse einer Gruppe von Patienten, die an atopischem Ekzem litten, mit denen einer Kontrollgruppe von gesunden Personen. Die Meßwerte zeigten eine breite Verteilung innerhalb der Gruppen, bei den meisten Ansätzen der Kulturen mit Mitogenen und/oder Allergenen wurden keine Unterschiede zwischen Atopikern und Kontrollpersonen entdeckt. Bei einigen jedoch waren die Verteilungen statistisch signifikant verschieden ($p < 0,05$). Auffällig in ihrer Charakteristik waren insbesondere einige Kulturansätze, in die Katzenepithel als Allergen eingesetzt worden war; bei ihnen fand sich eine hemmende Wirkung auf den Thymidineinbau.

Ferner wurden die IgE-Spiegel in den Überständen von Kulturansätzen bei Atopikern und Kontrollpersonen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen legten den Schluß nahe, daß eine IgE-Sekretion in vitro stattfindet; sie machen auch wahrscheinlich, daß IgE neu synthetisiert wird. Die Kulturen von Lymphozyten der Atopiker lieferten deutlich höhere Werte als die der Kontrollpersonen ($p < 0,001$). Innerhalb der Atopikergruppe bestand eine signifikante Korrelation zwischen Serum-IgE und in vitro IgE der Leerkulturen K_0^I ($p < 0,01$), wenn beide Werte in ihren dekadischen Logarithmen aufgetragen wurden. Durch Stimulation mit Mitogenen und/oder Allergenen wurden die IgE-Spiegel nur selten in statistisch signifikanter Weise beeinflusst. Wenn ein solcher Effekt eintrat, war er im Vergleich zu den Ergebnissen in Referenzkulturen hemmender Natur. Auch bei der Bestimmung der in vitro IgE-Konzentrationen lieferten die Ansätze mit Katzenepithel die auffälligsten Resultate von den drei verwendeten Allergenen. Die IgE-Werte der Kulturüberstände von verschiedenen Personen variierten in einem weiten Bereich, während bei einer Person die verschiedenen Ansätze nur geringfügigen Schwankungen unterworfen waren. Eine Sekretion von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern konnte nicht nachgewiesen werden, weder bei Atopikern, die in ihrem Serum keine spezifischen IgE-Antikörper besaßen (RAST-Klasse 0), noch bei solchen, die hohe Titer aufwiesen (RAST-Klasse 4).

Im folgenden sollen die Ergebnisse dieser drei Themenkreise eingehend besprochen werden.

4.1. Vorarbeiten zur Methodik

4.1.1. Begründung

Verschiedene Gründe veranlassten uns, den Versuchsreihen Arbeiten zur Methodik des Vorgehens beim Lymphozyten-transformationstest (LTT) und bei der Bestimmung der in vitro IgE-Werte voranzustellen. An erster Stelle zu nennen ist dabei die gleichzeitige Messung des Thymidineinbaus und der IgE-Konzentration im selben Ansatz. Während für beide Verfahren, wenn sie getrennt voneinander durchgeführt werden, in der Literatur eine Reihe von Informationen und Berichten zur Verfügung stehen, sind uns für das simultane Vorgehen keine Arbeiten bekannt geworden. Es stellte sich demnach die Frage, ob es möglich und günstig sei, Unterschiede im LTT und Unterschiede der IgE-Spiegel in denselben Ansätzen nach Variierung der Inkubationsdauer festzustellen, und wenn dies der Fall war, in welcher Weise die Parameter sich änderten.

Bei der Messung der IgE-Konzentrationen war es unerlässlich, unsere Meßmethode hinsichtlich Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Es war bald nach Beginn der Arbeiten offenkundig, daß die IgE-Spiegel der Überstände immer nur sehr kleine Werte an der unteren Grenze des Meßbereiches des angewandten Tests annahmen, weitaus kleinere, als sie üblicherweise bei der Bestimmung von Serum-Werten auftreten und für die vom Hersteller Zahlen über die Gütekriterien angegeben werden konnten. Mit der vom Hersteller empfohlenen Methode liegt die untere Nachweisgrenze nach seinen Angaben bei 0,5 U/ml. Dies reichte für viele unserer Proben nicht aus, so daß wir versuchten, die Empfindlichkeit zu verbessern. Wie also verhielt sich der Test, wenn man IgE-Werte unterhalb dieser Schwelle messen wollte? Mit wel-

chen Abweichungen mußte man bei der Durchführung der Messung rechnen? Konnten gleiche Ergebnisse in voneinander unabhängigen Meßvorgängen erzielt werden?

4.12. Versuche zur Kinetik

4.1.2.1. Kinetik des Lymphozytentransformationstests

Als Mitogen wurden PWM und als Allergen Katzenepithel willkürlich stellvertretend ausgewählt. Wir beschränkten uns auf diese wenigen Ansätze, da wir nur einen Eindruck über das Verhalten von Zellkulturen bei längerer Inkubation und Vergleichsmöglichkeiten gewinnen wollten.

In den Mitogenkulturen K_{PWM} und $K_{PWM/K1}$ fielen die Zählraten vom vierten zum siebten Tag hin kontinuierlich ab, so daß Maxima am vierten Tag (zwölf Stunden nach Zusatz von 3H -Thymidin) erzielt wurden. Trotz erheblicher Unterschiede in den Kulturbedingungen, der Markierung und dem Einsatz der Zellen berichteten mit den Fragen der Mitogenstimulation beschäftigte Arbeitsgruppen von ähnlichen Kurvenverläufen, wenn sie die drei Mitogene, die bei diesen Versuchen eingesetzt wurden, verwendeten (67, 71, 91, 126). Bei der Betrachtung derselben Zellpopulationen konnten wir keine Proportionalität der Zählwerte nach verschiedener Inkubationsdauer feststellen. Demnach konnte von dem Wert des vierten Tages nicht auf den Wert des siebten Tages einer Versuchsperson geschlossen werden. Wenn der Wert am vierten Tag eines Probanden größer war als der eines anderen, so konnte sein Wert am siebten Tag niedriger sein als der des anderen Probanden.

Der zeitliche Verlauf der Zählraten bestimmt sich nach Janossy et al. (67) zu Beginn aus der Aufnahme des Isotops in die DNA der Zellen, die ca. acht bis 16 Stunden

nach seiner Zugabe abgeschlossen ist. In Abhängigkeit von der Menge und der spezifischen Aktivität des Tracers wird dabei sein extrazellulärer Pool verbraucht oder ein bestimmter Spiegel aufrecht erhalten. Ein Teil der Zellen in der Kultur stirbt laufend ab. Durch Färbung mit Trypan-Blau konnte die durchschnittliche Überlebensrate von T-Lymphozyten auf ca. 70 % und von B-Lymphozyten auf ca. 50 % nach 48 Stunden bestimmt werden (67). ³H-methyl-Thymidin wird von intakten Zellen möglicherweise durch Umbau der DNA oder durch Demethylierung der radioaktiven Molekülgruppe entfernt (5, 122). Diese verschiedenen Faktoren führen bei einem Überwiegen der Synthese zu höheren, bei Überwiegen der negativen Einflüsse zu niedrigeren Werten und könnten den Verlauf der Kinetik erklären.

Erstaunlicherweise kam es in den beiden Versuchsansätzen, die acht Tage lang in Inkubation verblieben, zu einem erneuten Anstieg der Meßwerte nach dem siebten Tag. Wegen der geringen Fallzahl kann dabei ein zufälliges, nicht reproduzierbares Ergebnis nicht ausgeschlossen werden. Andernfalls mußte nach dieser Zeit der Nettoeinbau des Markers in die DNA seinen Verlust überwiegen. Es mußten Zellen in der Suspension vorliegen, die empfindlich für die Mitogenwirkung waren, und es mußte noch ein ausreichender extrazellulärer Spiegel des ³H-Thymidin zur Verfügung stehen. In Übereinstimmung mit der Annahme Mitogen-sensibler Zellen nach einer ersten Inkubationsperiode steht die Beobachtung, daß überlebende Zellen durch Reinkubation mit Con A erneut stimuliert werden konnten (67). Es fehlen jedoch Untersuchungen darüber, ob es sich dabei um Zellen handelt, die während der ersten Stimulation in einer Refraktärphase verharrten oder um Tochterzellen, die erneut in eine Mitose eintraten.

Sowohl für die Werte in K_0 als auch in K_{k1} gilt, daß sie während der gesamten Inkubationsdauer nur wenig variierten und im Durchschnitt nur mäßig absanken. Sie zeigten nicht die Charakteristik der Mitogenstimulationen mit ihren ausgeprägten Änderungen.

4.1.2.2. Kinetik der IgE-Spiegel in den Überständen von Lymphozytenkulturen

In den Versuchen zur Kinetik der IgE-Konzentrationen in den Überständen der Zellkulturen konnten wir, unabhängig von den Ansätzen, in der überwiegenden Anzahl der Fälle eine Zunahme der Werte mit der Dauer der Inkubation verzeichnen. Diese Erfahrung stimmt mit der anderer Autoren überein. Strittig ist, nach welcher Zeit die maximalen Spiegel erreicht werden. Während Patterson et al. (98) von einem Maximum nach 24 Stunden berichten, werden in anderen Studien Zeiträume bis zu sieben Tagen genannt (113, 121, 138, 140). Bei uns waren die höchsten Werte am häufigsten nach sieben Tagen nachzuweisen. Alle Arbeiten, die uns über die IgE-Kinetik bekannt wurden, haben die Schwäche gemeinsam, daß ihre Fallzahlen immer sehr klein waren; manchmal handelte es sich nur um Einzelbeobachtungen. Aus diesem Grund lassen sie keine zuverlässigen Aussagen zu. Auch Vergleiche zwischen den verschiedenen Abhandlungen sind nur schwer möglich. Die Versuchsbedingungen unterschieden sich in hohem Maße hinsichtlich der eingesetzten Zellzahlen pro Volumen Kulturmedium, der Zusammensetzung des Kulturmediums oder der Vorgehensweise bei der Kultivierung. Tatsächlich betonten die Autoren bei der Diskussion ihrer unterschiedlichen Ergebnisse gerade den Einfluß dieser Faktoren. Daneben dürften, unvermeidbar und unkontrollierbar, Wirkungen von den vorgefundenen Zellpopulationen eines bestimmten Individuums aus-

isolierte Zellkulturationen	Besonderheiten der Isolierung	Serum	Zellzahl/Volumen Medium	Antikörper	Inkubationszeit	Literatur
T-Zell-Fraktion, Non-T-Zellen des peripheren Venenblutes	-	NCS 2 % FCS 10 %	$1,5 \times 10^6$ /ml		1. Phase: 1-4 Tage 2. Phase: 1-9 Tage	Zuraw et al. 1981
Mononukleäre Zellen des peripheren Venenblutes	-	FCS 10 %	$10-15 \times 10^6$ /ml		1. Phase: 24 h 2. Phase: 6 Tage	Urena et al. 1979
Mononukleäre Zellen des peripheren Venenblutes	-	FCS 20 %	$1,3 \times 10^6$ /ml		2,4,6 Tage	Tjio et al. 1979
T-Zell-Fraktion B-Zell-Fraktion	-	hitzeinaktiviertes FCS 15 %	T-Zellen: bis 4×10^5 /ml B-Zellen: $0,4 \times 10^6$ /ml		1-7 Tage	Saxon et al. 1980
T-Zell-Fraktion B-Zell-Fraktion	zus. Isolierung von Isotyp-tragenden Zellen durch Immunelektrophorese	hitzeinaktiviertes FCS 15 %	bestrahlte T-Zellen: $3,33 \times 10^6$ /ml		7 Tage	Saxon et al. 1980
T-Zell- und B-Zell-Frakturen des peripheren Venenblutes und der Tonsillen	zus. Fraktionierung durch Lyse von T8-Zellen	hitzeinaktiviertes FCS 10 %	1×10^6 /ml		T-Zell-Fraktion: 24 h B-Zell-Fraktion: 7 Tage	Saryan et al. 1983

Tab. 41: Beispiele unterschiedlicher Voraussetzungen bei der Kultivierung humaner Lymphozyten, wie sie von verschiedenen Autoren zur Bestimmung der T-Zell-Sekretion angegeben werden.

gehen. Zum Beispiel könnte der Anteil der sigE^+ -Lymphozyten (Zellen, an deren Zellmembranen IgE-Moleküle nachweisbar sind) zu einem bestimmten Zeitpunkt im Blut des Probanden entscheidend sein für das Verhalten der Zellen *in vitro* (98), oder die Anzahl und Aktivität anderer Zellen, wie Monozyten oder Granulozyten, in der Kultur bestimmen das Ausmaß der IgE-Antwort (114, 157).

Schließlich muß die Möglichkeit der *in vivo*-Stimulation der Zellen in die Überlegungen mit einbezogen werden; von manchen Seiten wird ihr die größte Bedeutung bei der *in vitro* IgE-Sekretion zugemessen (39, 113, 138).

Unsere Ergebnisse zeigen, daß zwischen den Zellpopulationen verschiedener Probanden erhebliche Variabilität besteht. Darauf weisen auch Saxon et al. (121) hin. Angesichts unserer kleinen Fallzahl erklärt sich daraus die Notwendigkeit, bei der Darstellung der Ergebnisse Summen anzugeben. Naturgemäß erhielten damit die Werte mit den höheren Beträgen ein größeres Gewicht auf das Gesamtergebnis, die Kurven geben dennoch die Tendenz der Resultate auch der einzelnen Zellpopulationen richtig wider. Am häufigsten wurden die höchsten Werte nach dem siebten Tag der Inkubation bestimmt, sehr selten waren die Maxima am vierten Tag zu messen.

Neben diesen Erkenntnissen war eine andere Einsicht bei diesen Versuchen von Wert. Wie sich aus den Abbildungen ableiten läßt, öffneten sich die Kurvenscharen bei Verwendung verschiedener Stimulationslösungen vom vierten zum siebten Tag hin. Während am vierten Tag bei beiden Versuchsreihen die IgE-Summen in allen Ansätzen nahezu gleich waren, waren die Differenzen nach sechs Tagen weitaus stärker und am siebten Tag am höchsten. Wir schlossen daraus, daß die Wirkung von Mitogenen und Allergenen nach längerer Inku-

bationsdauer besser beurteilbar seien als nach nur vier Tagen.

In der Abwägung zwischen den Kinetikergebnissen aus LIT und IgE-Spiegeln trafen wir schließlich die Entscheidung, die Kultivierungsdauer auf sieben Tage festzulegen. Ein Vergleich des LIT sollte auch mit Werten nach sieben Tagen möglich sein, wenn auch diese nicht mehr die maximalen Einbauraten angaben. Eine noch längere Inkubation wollten wir vermeiden, um der Möglichkeit einer erneuten Stimulation, wie wir sie bei zwei Probanden beobachtet hatten, vorzubeugen. Gegen eine längere Kultivierung sprach auch die erhöhte Gefahr der Kontamination durch Bakterien oder durch Pilze. Hinsichtlich der IgE-Spiegel schien die Inkubationsdauer von sieben Tagen sehr gut geeignet, sowohl messbare Konzentrationen zu erhalten wie ihre Beeinflussbarkeit durch unterschiedliche Versuchsbedingungen zu erkennen und insbesondere spezifische Effekte von Allergenen zu beurteilen.

4.1.3. Versuche zur Methodik der IgE-Bestimmung

Bei der Beurteilung der Güte unserer modifizierten RIA- und EIA-Verfahren unterschieden wir zwischen

1. der intra-Test-Übereinstimmung (" Intraassay "),
2. der inter-Test-Übereinstimmung (" Interassay ") und
3. der Übereinstimmung zwischen Erwartungswert und Meßwert (bzw. Mittelwert des Meßwertes).

4.1.3.1. Gütekriterien des modifizierten PRIST

1. Die intra-Test-Übereinstimmung, deren entscheidende Maßzahlen die Standardabweichungen s und die mittleren Fehler der Mittelwerte $s_{\bar{x}}$ sind, war bei beiden Versuchs-

ansätzen des PRIST sehr gut. Mit Ausnahme der Werte x_{11} (Erwartungswert $E = 0,1 \text{ U/ml}$) waren die Standardabweichungen durchweg kleiner als 10 % der zugehörigen Mittelwerte. Die mittleren Fehler der Mittelwerte waren in nur einem Fall größer als $0,1 \text{ U/ml}$. Dieses Ergebnis berechnete dazu, die Meßwerte auf zwei Stellen nach dem Komma genau zu berechnen.

2. Eine gute Übereinstimmung der Mittelwerte zeigte sich zwischen den beiden durchgeführten Testreihen, insbesondere im Bereich kleiner 1 U/ml . Darüber waren die Differenzen etwas größer. Auffällig war, daß bei der zweiten Versuchsreihe die Werte häufiger niedriger bestimmt wurden als in der ersten. Dies konnte mit dem Einfrieren und Wiederauftauen in Zusammenhang stehen oder aber mit der Konstruktion einer neuen Eichgeraden. Die Erstellung der Eichkurve kann dann eine erhebliche Fehlerquelle sein, wenn Standards aus verschiedenen Kits und verschiedene Marker-Lösungen verwendet werden. Da unsere Versuche sich über einen Zeitraum von ca. zwei Jahren erstreckten, konnte schon aus zeitlichen Gründen diese Fehlermöglichkeit nicht ausgeschlossen werden. Dennoch war es grundsätzlich gewährleistet, daß die Proben eines Probanden mit denselben Standards ausgewertet wurden, so daß bei einem mehr qualitativen Vergleich zwischen Überständen derselben Zellpopulation, wie wir ihn durchführten, dieser Faktor nicht ins Gewicht fällt.

3. In der Hälfte der untersuchten Lösungen (in sieben) war die prozentuale Abweichung der Mittelwerte von den Erwartungswerten kleiner als 10 %, in nur zwei Fällen war sie größer als 20 %. Bei einem dieser beiden war der Wert x_{11} (Erwartungswert $E = 0,1 \text{ U/ml}$) betroffen, bei dem kleine absolute Differenzen große relative Veränderungen verursachen mußten. Damit erwies sich der PRIST in der von uns ausgeführten Form auch in dieser Hinsicht als zu-

friedenstellend. Wir konnten zeigen, daß es möglich ist, auch IgE-Werte zu bestimmen, die kleiner als 0,5 U/ml sind. Tatsächlich ließen sich Werte bis ca. 0,1 U/ml zuverlässig bestimmen, und wir verfahren bei der Auswertung so, daß die IgE-Spiegel auf die zweite Zehnerpotenz nach dem Komma gerundet wurden. Die teilweise größeren Abweichungen der Meßwerte von den Erwartungswerten könnten mit Ungenauigkeiten beim Verdünnen des Standards (es wurde ein 1000 U/ml-Standard 1:250 bis 1:10 000 verdünnt!) erklärt werden. Da der zweite Ansatz davon in stärkerem Maße erfaßt war, könnten durch den Einfrier-Auftauvorgang IgE-Moleküle eine Konformationsänderung durchgemacht haben oder zerstört worden sein.

Durch die Versuche des Kapitels 3.1.2.4. konnten die Aussagen über die Güte des modifizierten PRIST bestätigt und untermauert werden.

4.1.3.2. Gütekriterien des Enzymimmunoassays (Enzygnost)

Die Beurteilung dieses EIA wurde in der gleichen Weise vollzogen wie die des RIA. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Methoden ergab sich daraus, daß die zweite Versuchsreihe des Enzymtestes nicht in mehrmonatigem Abstand, sondern unter veränderten Inkubationsbedingungen gleichzeitig mit der ersten stattfand. Es wurde dabei die Zeit der dritten Inkubationsperiode von 30 Minuten auf 60 Minuten verlängert. Nach unseren Prüfungskriterien zeigte sich:

1. Die intra-Test-Übereinstimmung war bei beiden Ansätzen gut, aber schlechter als beim RIA. Darüberhinaus war das Auflösungsvermögen schlechter. Eine Extinktionsänderung um eine unterscheidbare Einheit beim Enzymtest bewirkte nämlich eine rechnerische Differenz der IgE-Konzentration

um ca. 0,05 U/ml; beim RIA war für die gleiche Änderung der IgE-Konzentration ein Unterschied von 10 bis 20 Counts pro Minute je nach Kit erforderlich, so daß der PRIST auch - zumindest theoretisch - kleinere Unterscheidungen ermöglichte.

2. Wesentlich weniger befriedigend war die Interassay-Übereinstimmung der beiden Versuchsreihen des Enzymimmunoassay. Die Differenzen zwischen den beiden zusammengehörigen Mittelwerten waren vor allem im Bereich unter 1 U/ml beträchtlich. Sie erklären sich, da beide Bestimmungen gleichzeitig unter den gleichen äußeren Verhältnissen durchgeführt wurden, in erster Linie aus den unterschiedlichen Zeiten der dritten Inkubationsperiode.

3. Die Erwartungswerte wurden in beiden Ansätzen bei weitem schlechter getroffen als bei den RIA-Messungen. Beim ersten traten erhebliche Abweichungen von bis zu 100 % auf. Der Erwartungswert 4 U/ml konnte sehr genau mit einer minimalen Abweichung von 2 % gemessen werden, alle übrigen wurden um 20 % und mehr verfehlt. Im zweiten Ansatz gestalteten sich die entsprechenden Werte etwas besser (Abweichungen zwischen 6 und 90 %, am häufigsten zwischen 10 und 20 %). Während beim ersten Ansatz bis auf die größte Konzentration von 4 U/ml alle Proben zu niedrig bestimmt wurden, waren die Ergebnisse des zweiten Ansatzes unterschiedlich. Die kleinen Werte 0,1 U/ml und 0,25 U/ml wurden zu hoch, die über 0,5 U/ml liegenden zu niedrig gemessen. In der ersten Versuchsreihe war in der Probe mit dem Erwartungswert $E = 0,1$ U/ml IgE nicht nachzuweisen. Nach längerer Dauer des dritten Inkubationsschrittes, bei dem die photometrierbare enzymatische Reaktion ablief, konnte in ihr IgE, wenn auch sehr ungenau, gefunden werden. Durch Variation der Versuchsbedingungen, z. B. durch Verdünnung der Lösung mit Enzym-Immunglobulin-komplex und anschließender, verlängerter Reaktionsdauer

bei Substratsättigung, könnten also vielleicht bei kleinen IgE-Werten bessere Ergebnisse erzielt werden.

Eine wichtige Fehlerquelle, die den Meßvorgang sicherlich negativ beeinflusste, ergab sich daraus, daß der Enzygnost für einen Meßbereich zwischen 10 U/ml und 1000 U/ml ausgelegt ist. Niedrigere Werte konnten nur durch Verdünnung der Standards bestimmt werden. Die Herstellung der originalen Standards erfordert die Auflösung der Lyophilisate. Anschließend müssen diese Lösungen in geeigneter Weise für die an der Größe der Meßwerte orientierte Eichkurve verdünnt werden. Zuletzt ist es dann noch notwendig, eine Inkubationslösung mindestens im Verhältnis 1:1 einzubringen. Auch sämtliche zu messende Proben müssen mit dieser Inkubationslösung versetzt werden. Von der arbeitstechnischen Seite her ist also der Enzygnost weit aufwendiger als der PRIST.

4.1.3.3. Vergleich zwischen RIA und EIA

Bei einem wertenden Vergleich zwischen dem Radioimmunoassay und dem Enzymimmunoassay schnitt unserer Meinung nach der PRIST besser ab. Mehrere Gründe führten uns zu diesem Urteil:

1. Die technische Ausführung des PRIST war weitaus einfacher und weniger zeitaufwendig als die des Enzygnost. Die Schwierigkeiten des Enzymtestes begannen schon mit der Zubereitung der Standards, die erst auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt werden mußten, bevor sie eingesetzt werden konnten. Dann war es nötig, sämtliche Proben mit einem Inkubationsmedium zu versetzen, Arbeiten, die beim RIA nicht erforderlich waren. Für die Extinktionsmessungen stand uns kein automatisch arbeitendes Photometer zur Verfügung, so daß alle Ansätze von Hand bestimmt werden mußten.

2. Nach unseren Ergebnissen konnte in dem Meßbereich, in dem wir unsere IgE-Werte erwarteten, der PRIST genauer und zuverlässiger messen als der Enzygnost. Wir berechneten die IgE-Werte aus den Eichkurven auf zwei Dezimalstellen nach dem Komma genau, wobei beim PRIST die Standardabweichungen als Maß für die Zuverlässigkeit bei den meisten Ansätzen kleiner waren als beim Enzygnost (beim RIA bis maximal 0,11, beim EIA bis 0,20). Gleiches gilt für die Genauigkeit, die wir aus den Abweichungen der Meßwerte von den Erwartungswerten beurteilten. Danach zeigte sich der RIA bei den meisten Proben dem EIA überlegen.

3. Das Auflösungsvermögen des PRIST war besser als des Enzymtestes. Dies ergab sich daraus, daß eine Änderung der Extinktion um eine unterscheidbare Einheit eine Änderung des IgE-Wertes um ca. 0,05 U/ml bewirkte. Dieselbe Änderung der IgE-Konzentration trat beim radioaktiven Test ein, wenn sich die Zählraten um 10 bis 20 Counts unterschieden. Diese Überlegung war bei unseren Versuchen nicht von praktischer Bedeutung, sie wäre es bei Genauigkeitsbestimmungen mit einer größeren Zahl von Bestimmungen einzelner Proben, bei denen die Meßwerte den wahren Werten mit Hilfe des PRIST sehr gut angenähert werden könnten.

Der wichtigste Einwand gegen den RIA ist sicherlich der Umgang mit der Radioaktivität, der ein sorgfältiges und umsichtiges Arbeiten erfordert. Darüberhinaus ergeben sich Schwierigkeiten mit der Entsorgung der Abfälle. Wenn daher auch die Vorteile bei der Durchführung und der Auswertung der Bestimmungen für den RIA sprechen, so sollten nicht seine Nachteile der Belastung der Umwelt übersehen werden. Beim Enzygnost andererseits muß mit einem möglicherweise karzinogenen Stoff (Diaminophenol) gearbeitet werden. Eine Lösung dieser Probleme könnte die Entwicklung einfacherer, genauerer und sicherer enzymatischer Tests bieten.

4.2. Der Lymphozytentransformationstest (LTT)

4.2.1. Bedeutung des LTT beim atopischen Ekzem

Der Lymphozytentransformationstest besitzt in der Klinik eine Reihe von Indikationen, u. a. zur Diagnostik zellulärer Immundefekte und zum Nachweis einer Sensibilisierung gegenüber Antigenen (16). Je nach Fragestellung wird er mit unspezifischen Stimulantien (Mitogene wie PWM, PHA, Con A u. a.) oder mit spezifischen Antigenen (Tuberkulin, Tetanustoxin, Candidin, Allergene) durchgeführt. Im Falle des atopischen Ekzems werden einerseits ein Defekt von T-Suppressor-Zellen, andererseits auch eine Provokation mit Allergenen für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich gemacht; besonders häufig sind Sensibilisierungen gegen Katzenepithel, Hausstaubmilbe und Gräserpollen (1, 2, 52, 53, 141). Es lag also nahe, Lymphozyten von Atopikern mit unspezifischen und spezifischen Stimulantien zu inkubieren und sie mit den Reaktionen der Zellen von gesunden Kontrollpersonen zu vergleichen.

Über erniedrigte Proliferationsraten bei Patienten mit atopischem Ekzem gegenüber Mitogenen, die vorzugsweise T-Zellen stimulieren, wie PHA und Con A, berichteten Stranegard et al. (135). Da das verminderte Ansprechen der Zellen auf PHA stärker ausgeprägt war als die Erniedrigung der Erythrozyten-Rosettenbildung und die PHA-Antwort stärker eingeschränkt war als die Con A-Antwort, vermuteten sie einen innerhalb der T-Zell-Subpopulationen unterschiedlich ausgeprägten Defekt. PHA sollte ihrer Ansicht nach auch die Suppressor-T-Zellen erfassen und die stärkere Beeinträchtigung der PHA-Stimulation demnach einen relativen T-Suppressor-Zell-Mangel (funktionell oder zahlenmäßig) widerspiegeln. Bei Stimulation mit PWM konnten sie keine Unterschiede zwischen Erkrankten und Kon-

trollpersonen finden (134, 135). Andere Autoren konnten diese Befunde nicht bestätigen. Die Arbeitsgruppen um Pass (97) und um Grove (44) teilten normale Stimulationswerte gegenüber PHA mit. Schuster et al. (125) prüften in Präinkubations- und Transferversuchen die T-Zell-Funktionen vergleichend zwischen Erkrankten und Gesunden und konnten keine Unterschiede aufzeigen. Stingl et al. (132) wiederum stellten eine verminderte Funktion und einen Defekt der T-Suppressor-Zellen fest. In einem anderen Licht als Strannegard sehen Ishikawa et al. das Mitogen PWM (62); sie führten bei einer Patientin mit Hyper-IgE-Syndrom und Ekzem Lymphozytentransformationstests vor und nach erfolgreicher Therapie durch Plasmaaustausch durch; bei allen drei Substanzen PHA, Con A und PWM fanden sie einen Anstieg der Stimulationswerte nach der Behandlung gegenüber vorher. Nach ihren Ergebnissen sollte der LIT in inverser Beziehung zur Schwere der Erkrankung stehen. Zum gleichen Schluß kamen ursprünglich Strannegard et al. (134), stellten ihn aber in einer späteren Arbeit wieder in Frage (135). Es bestehen also erhebliche Unsicherheiten darüber, wie der Lymphozytentransformationstest beim atopischen Ekzem zu bewerten ist, und welche Schlußfolgerungen er zuläßt (156).

4.2.2. Faktoren, die den LIT beeinflussen

Es ist nicht verwunderlich, mit diesen Schwierigkeiten konfrontiert zu werden, berücksichtigt man nur die Fülle von Faktoren, die auf die Lymphozytentransformation wirken können und deren Einflüsse nie völlig auszuschließen sind. Im folgenden sollen mögliche störende, verfälschende oder modulierende Variable besprochen werden. Sie sollen nach den zwei verschiedenen Ebenen eingeteilt werden, in denen sie in Erscheinung treten können:

1. Variable, deren Grundlagen im Individuum des einzelnen

Probanden zu suchen sind, und

2. Variable, die sich aus den Bedingungen der Kultivierung und der damit in Zusammenhang stehenden Manipulationen ergeben.

Die für den LTT wesentlichen, im Probanden wirksamen Faktoren leiten sich aus den Beziehungen der Zellarten und ihrer Subpopulationen, den Hormonwirkungen und äußeren Einwirkungen auf den Organismus, z. B. durch Medikamente oder durch infektiöse Agentien, ab. Im Vordergrund bei der Betrachtung der Zusammensetzung der Zellsubpopulationen stehen T- und B-Lymphozyten als die Zielzellen der Mitogene. Daß auch andere Zellen, z. B. Monozyten, an der Stimulation beteiligt sind und sie durch Ereignisse, denen sie in vivo ausgesetzt waren, die in vitro-Antwort der Lymphozyten zu steuern vermögen, muß auf Grund von in vitro-Versuchen vermutet werden, über die wir weiter unten berichten.

Die Relationen zwischen B- und T-Lymphozyten ändern sich mit dem Lebensalter, während die absoluten Zahlen nur geringfügig variieren. Kinder weisen relativ mehr T-Lymphozyten auf, während alte Menschen mehr B-Lymphozyten im peripheren Blut besitzen (22). Nach Bratescu (12) sind sie auch jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen; die absolute Zellzahl ändert sich während des Jahres kaum, sofern nicht Erkrankungen eine Leukopenie oder eine Leukozytose verursachen. Der Anteil der B-Lymphozyten verdoppelt sich aber im Winter gegenüber dem Sommer. Daneben unterliegen die Lymphozyten im peripheren Blut einem zirkadianen Rhythmus, der möglicherweise mit dem Plasma-Cortisol-Spiegel in Verbindung steht (36, 137). Nach Gabe von Steroidhormonen (60 mg Prednisolon) erfahren die Lymphozyten eine Umverteilung: Die absolute Zahl vermin-

dert sich, der Anteil der T-Lymphozyten wird niedriger, während der Anteil der B-Lymphozyten ansteigt (154).

In vitro wurde die Mitogenstimulation durch Glukokortikoide in individuell unterschiedlicher Weise beeinflußt. Am häufigsten fand man eine dosisabhängige Hemmung der Transformationsraten (7, 51), wobei die Empfindlichkeit der Zellen verschiedener Spender um den Faktor 10^5 der Hormondosis variieren konnte. Bei einzelnen Zellkulturen konnte aber auch eine Verstärkung der Proliferation durch Kortikoide beobachtet werden (7). Tavadia et al. (137) untersuchten die Lymphozytentransformation in Abhängigkeit vom Cortisol-Tagesprofil. Im Gegensatz zu den in vitro-Versuchen beschrieben sie eine Proportionalität zwischen der Transformationsrate und der Höhe der Cortisolkonzentration, mit der absoluten Zahl der Lymphozyten war sie invers korreliert. Zu einem anderen Ergebnis kamen in ähnlichen Versuchen Eskola et al. (36), die bei PHA- und Con A-Stimulation Minima am frühen Morgen und Maxima am Abend feststellten, also eine inverse Beziehung zum Plasma-Cortisol-Spiegel. Diese kurze Zusammenstellung zeigt auf, daß verschiedene Autoren zu stark voneinander abweichenden Antworten bei ähnlichen Fragestellungen über den LTT kommen und wirft ein Licht auf die Problematik, mit der man bei der Wertung dieses Tests zu rechnen hat.

Wir versuchten, durch die Auswahl der Patienten und der Kontrollpersonen und durch die Einhaltung von Zeitplänen diese Störeinflüsse so gering wie möglich zu halten. Beide Gruppen gleichen sich in ihrer Zusammensetzung nach Geschlecht und Alter. Die Patientengruppe umfaßte neun männliche und sechs weibliche Personen mit einem Altersdurchschnitt von $30,9 \pm 15,1$ Jahren (Variationsbreite 19 bis 68 Jahre), die Kontrollgruppe acht männliche und sechs weibliche Personen mit einem durchschnittlichen Alter von

30,2 $\pm$ 9,4 Jahren (Variationsbreite 22 bis 48 Jahre). Die Blutproben wurden alle vormittags in der Zeit zwischen 9⁰⁰ und 10⁰⁰ Uhr nach demselben Verfahren abgenommen und sofort verarbeitet. Die Jahreszeit konnten wir nicht berücksichtigen, da sich unsere Versuche über einen Zeitraum von zwei Jahren erstreckten, wobei die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse in der Zeit vom Sommer 1981 bis Sommer 1982 gewonnen wurden. Immerhin konnten wir es einrichten, daß Atopiker und Kontrollpersonen parallel untersucht wurden. Meist wurden an einem Tag die Zellen je eines Erkrankten und eines Gesunden oder im Abstand von einer Woche jeweils zweier Atopiker und zweier Vergleichspersonen in die Kultur aufgenommen. Jahreszeitliche Unterschiede könnten damit beim Vergleich von Einzelpersonen, nicht aber beim Vergleich der Gruppen sich bemerkbar machen. Genausowenig sollten sich Schwankungen, die sich aus dem zirkadianen Rhythmus ergeben könnten, wesentlich auswirken, da alle Proben zur ungefähr gleichen Zeit gewonnen wurden. Anders verhielt es sich mit äußeren Einflüssen auf die Versuchspersonen, wobei in erster Linie Medikamente in Frage stehen. Es konnte zwar vermieden werden, solche Personen in die Studie aufzunehmen, die in systemischer Form mit Glukokortikoiden behandelt wurden, es war aber unmöglich, jegliche medikamentöse Wirkungen auszuschließen. Die Patienten, die an einer schweren Form des atopischen Ekzems litten, wurden in der Regel lokal mit Steroidhormonen und häufig systemisch mit Antihistaminika behandelt. Ältere Menschen konnten an internistischen Krankheiten leiden und unter einer entsprechenden medikamentösen Therapie stehen. Aus naheliegenden medizinischen Gründen konnte auf eine Fortsetzung der Behandlung nicht verzichtet werden; wir müssen deshalb unsere Versuchsergebnisse unter dem Vorbehalt von Arzneimittelwirkungen darstellen, deren Bedeutung von uns nicht abzuschätzen ist. Aussagen über Differentialblutbild und Immunstatus,

vielleicht sogar Charakterisierung von Lymphozytensubpopulationen waren uns ebensowenig möglich. Ihre Untersuchung hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt und bleiben anderen Untersuchungen in unserem Labor vorbehalten (Dissertation P. Thomas). Wir können an dieser Stelle nur darauf verweisen, daß diese probandenabhängigen Parameter möglicherweise von Bedeutung für den Lymphozyten-transformationstest sein können.

In Kultur, also in einem artifiziellen, unphysiologischen Milieu, ist das Verhalten der Zellen vor allem von den vorliegenden Bedingungen abhängig. Auf dieser Ebene stehen dem Untersucher Möglichkeiten offen, einzelne Parameter gezielt zu verändern und ihre Effekte zu studieren. Tatsächlich konnten in vitro in vielen Versuchsanordnungen Einflüsse verschiedenster Art auf die Lymphozyten-transformation nachgewiesen werden, die aber, wie auch in vivo wirksame Faktoren, häufig zu diskordanten oder gar widersprüchlichen Aussagen führten.

Nur wenig ist über die Wirkung von Serum bekannt, dessen Zusatz zu den verschiedenen Medien bei der Durchführung des Tests unerläßlich ist. Verwendung finden z. B. autologes oder heterologes Humanserum (5, 51), Humanserum von Spendern der Blutgruppe AB Rh⁻ (7, 19), hitzeinaktiviertes Kälberserum (10), fötales Kälberserum (FCS) (67, 75) oder andere. In der Regel wird das Serum in einer Menge von 10 bis 20 % des gesamten Kulturmediums eingesetzt. Wir gebrauchten bei unseren Versuchen FCS, das als nicht mitogen eingestuft wurde (68), von dem aber andererseits eine Hemmung der PHA-Stimulation bekannt wurde (150). Greaves et al. (43) sahen demgegenüber bei Milzzellen eine verstärkte PWM-Antwort in einem FCS-Medium im Vergleich mit einem hitzeinaktivierten humanen AB-Serum. Yamamura et al. (150) fanden für ein

autologes Serum ein Stimulationsoptimum bei einer Menge von 10 % des Mediums und abgeschwächte Antworten bei höheren und niedrigeren Konzentrationen, so daß möglicherweise auch diese Größe berücksichtigt werden muß.

Bei der Zellisolierung über Ficoll-Hypaque gewinnt man nach übereinstimmenden Berichten ca. 80 bis 90 % Lymphozyten, von denen mehr als 95 % lebensfähig sind. 10 bis 20 % der Zellen sind Monozyten und Granulozyten (89, 102, 149). Zusätzlich treten auch Erythrozyten auf, die aber nicht weiter quantifiziert wurden. Bei den Lymphozyten ließen sich ca. 70 % T-Lymphozyten (Schafserythrozyten-Rosetten bildende Zellen) und ca. 20 % B-Lymphozyten (Immunglobulin tragende Zellen) unterscheiden (102). Die Bedeutung der Monozyten wird sehr kontrovers beurteilt: Einige Autoren streiten die Notwendigkeit ihrer Beteiligung an der Lymphozytenstimulation ab (43, 149), andere sprechen ihnen modulierende Fähigkeiten zu (86, 93, 102, 155). Verstärkung oder Hemmung der Proliferation hängen nach den Versuchsergebnissen der letzteren vom Anteil der Monozyten in der Kultur ab; wenige Zellen (2 - 5 %) verstärken, ein großer Prozentsatz (10 - 20 %) schwächt ab. In einer anderen Spezies, beim Meerschweinchen, kann eine T-Lymphozyten-Fraktion nur in Anwesenheit von Makrophagen proliferieren, wenn sie mit Con A und PHA inkubiert werden (115). Ihre Wirkung entfalten die Monozyten wahrscheinlich über lösliche Mediatoren, wobei ein Lymphozyten-aktivierender Faktor (LAF = Interleukin I) (58) und Inhibitoren (93) beschrieben worden sind. Granulozyten scheinen keinen wesentlichen Einfluß bei der Lymphozytentransformation auszuüben (122).

Der Einbau des ^3H -Thymidin ist abhängig von der spezifischen Aktivität und der angebotenen Konzentration des Markers (5) und in hohem Maße von der in der Kultur

befindlichen Zellzahl. Es sollten nicht mehr als 10^6 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter Kulturvolumen eingesetzt werden (122, 125), da bei größerer Zelldichte die Linearität der Aufnahme nicht mehr gewährleistet ist und zum Teil niedrigere Stimulationsraten verzeichnet werden. Es wurde auch die Verwendung von nur 2×10^5 Zellen pro Milliliter Kulturvolumen empfohlen, um ein optimales Ergebnis zu erzielen (150).

Die Behauptung, PHA und Con A seien T-Zell-Mitogene und PWM in erster Linie ein B-Zell-Mitogen, ist sicherlich vereinfachend. Bei allen drei Mitogenen wurden T- und B-Zell-Aktivierungen beobachtet. Es muß bei der Beurteilung jedoch darauf geachtet werden, mit den Zellen welcher Spezies und welchen Organs die Versuche unternommen wurden. So reagierten humane Lymphozyten aus dem peripheren Blut in anderer Weise auf PWM und PHA als solche aus der Milz oder den Tonsillen (43, 147), und völlig abweichende Resultate wurden registriert, wenn Zellen von Mäusen oder Ratten oder anderer Tiere herangezogen wurden. Doch auch wenn nur auf menschliche Zellen aus dem peripheren Blut Bezug genommen wurde, weisen die Untersuchungen starke Unterschiede auf, deren Ursachen möglicherweise in verschiedenen gestalteten Versuchsbedingungen zu suchen sind. Die B-Zell-Stimulation, die nach Mitogenen häufig zu erkennen war, schien dabei indirekt durch Vermittlung von T-Zellen und in Abhängigkeit ihrer Anzahl zu erfolgen (3, 33, 86, 100, 126). Die Bedeutung der Mitogenkonzentration für unterschiedliche Effekte auf Lymphozytensubpopulationen wurden gleichermaßen herausgestellt (88, 144, 150, 153).

Aus der Vielzahl der möglichen Variationsmöglichkeiten und ihrer gegenseitigen Wechselwirkungen ergibt sich zum einen, daß der Lymphozytentransformationstest nur auf der

Grundlage standardisierter Bedingungen durchgeführt und nur innerhalb dieser Grenzen gewertet werden sollte. Zum anderen sollten Vergleiche mit Ergebnissen, die auf anderen Voraussetzungen aufbauen, mit äußerster Zurückhaltung erfolgen. Es sollten folglich Aussagen nur gegenüber Kontrollversuchen unter den Standardbedingungen einer Versuchsanordnung getroffen werden.

4.2.3. Maßzahlen der Meßergebnisse beim LTT

Unter Berücksichtigung der möglichen Einflußfaktoren, wie wir sie vorher darstellten, können die starken interindividuellen Schwankungen der Stimulationsraten, die in den Variationsbreiten ihren Ausdruck finden, nicht überraschen. Sie waren in unseren Kulturen, die über sieben Tage geführt wurden, ebenso ausgeprägt wie die bei anderen Untersuchern, auch wenn diese andere Zeiten einhielten (122, 135, 150, 155). Es ist auch aus diesem Grunde nur schwer möglich, " Normalwerte " der Lymphozytenstimulation zu finden, was die Forderung bestätigt, sich durch Mitführung einer eigenen Kontrollgruppe Bezugswerte zu schaffen.

Als Beleg dafür, daß die technische Ausführung der Tests korrekt war, werten wir die Übereinstimmung in der Verteilung der Variationskoeffizienten, die aus den Einzelwerten der Dreifachansätze berechnet wurden, mit jener, die Schellekens und Eijsvogel (122) angegeben haben.

4.2.4. Vergleich des LTT bei Atopikern und Kontrollpersonen

4.2.4.1. Stimulation mit Mitogenen

Es konnte unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen nur bei der PWM-Stimulation ein statistisch signifikanter

Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen mit einer verstärkten Proliferation bei den Atopikern aufgezeigt werden. Wie schon erwähnt, steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu dem von Strannegard et al. (134, 135), die zwar unter PHA und unter Con A, nicht aber unter PWM signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit atopischem Ekzem und Gesunden nachwiesen. Der wesentliche Gegensatz besteht darin, daß die genannten Autoren mit den von ihnen eingesetzten Mitogenen abgeschwächte ^3H -Thymidin-Einbauraten feststellten, während wir eine verstärkte Proliferation der Zellen bei der Patientengruppe unter PWM konstatierten. Eine mögliche Lösung dieser scheinbaren Widersprüche - sofern wir auf Grund der Einschränkungen unserer früheren Ausführungen überhaupt einen Lösungsvorschlag anbieten sollen - könnte so aussehen: Es ist bekannt, daß die Transformation von B-Zellen beim Menschen durch T-Zellen vermittelt wird (9, 41, 68). Darüberhinaus reagieren T-Zellen vor den B-Zellen auf den Stimulus (68). Möglicherweise beobachteten wir als Folge der langen Kultivierungsdauer stärker ausgeprägte B-Zell-Effekte. Damit stünde unser Ergebnis im Einklang mit der Hypothese eines relativen Übergewichts der T-Helfer-Zellen über die T-Suppressor-Zellen. Die höheren Werte der Atopiker entsprächen dann einer vermehrten B-Zell-Proliferation.

Nach PHA- und nach Con A-Stimulation konnten keine Unterschiede in der Verteilung der Meßergebnisse aufgedeckt werden. Bei beiden Substanzen streuten die Einzelwerte der Versuchspersonen in den zwei Gruppen um Faktoren zwischen dem zwei- bis sechsfachen der niedrigsten zugehörigen Meßwerte und zeigten in diesem Bereich etwa gleiche Größen.

4.2.4.2 Stimulation mit Allergenen

Bei Provokation der Zellkulturen mit Allergenen wurden bei den Kontrollpersonen im Durchschnitt höhere Werte gemessen als in den zugehörigen Leerkulturen K_0 . Dies war auch bei den Patienten der Fall mit Ausnahme der Versuche, in denen Katzenepithel als Allergen verwendet worden war. Dieses Allergen zeichnete sich gegenüber den beiden anderen - Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*) (D) und Gräserpollen (G) - dadurch aus, daß es Verteilungsunterschiede zwischen der Atopikergruppe und der Vergleichsgruppe bewirkte. Erstaunlicherweise reagierten die Zellen der Kontrollpersonen mit einer durchschnittlich stärkeren Proliferation im Vergleich mit den zugehörigen Kulturen ohne Zusatz, die der Atopiker mit einer schwächeren, ein Ergebnis, welches wir wegen der möglichen Beteiligung der Allergene bei der Pathogenese des atopischen Ekzems nicht erwartet hatten. Gruppenspezifische Merkmale fanden wir demnach nur für das Allergen Katzenepithel, das bei den Atopikern zu schwächeren Antworten führte. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich bei den Konzentrationen K1 (Verdünnung der Stammlösung 1:10) und K3 (Verdünnung 1:1000) nachweisen. K2 erbrachte eine Annäherung der Verteilung in den zwei Gruppen, indem es bei den Vergleichspersonen zu geringer betonten Proliferationssteigerungen führte, während K1 und K3 bei ihnen verstärkend wirkten. Die Zählraten der Kulturen mit Katzenepithel waren bei den Patienten gegenüber ihren Leerkulturen geringfügig erniedrigt, allein K3 konnte bei ihnen zu erhöhten Werten führen.

Die Allergene Hausstaubmilbe und Gräserpollen erwiesen sich im Durchschnitt als mäßige Stimulatoren in den Konzentrationen A1 (Verdünnung der Stammlösungen 1:10), bei niedrigeren Konzentrationen wurden Annäherungen an

die Vergleichswerte der Leerkulturen K_0 verzeichnet. Gruppenunterschiede waren bei diesen Allergenen nicht abzulesen. Zwischen den einzelnen Versuchspersonen konnten die Meßwerte bzw. die Stimulationsindices erheblich streuen; die Variationsbreiten weisen dies aus, die zwischen dem 0,37- und den 3,8-fachen der Leerwerte liegen.

4.2.4.3. Stimulation mit Mitogenen und Allergenen

Bei der überwiegenden Zahl der Versuche verursachte die Zugabe von Allergenen zu Zellkulturen mit Mitogenen eine Hemmung der ^3H -Thymidin-Einbaurrate gegenüber den reinen Mitogenstimulationen. Diese Feststellung gilt für alle möglichen Kombinationen der drei Mitogene und der drei Allergene in ihren unterschiedlichen Konzentrationen. Zusatz von Allergenen hatte also eher eine verminderte Mitogenantwort zur Folge als eine verstärkte. Dieser Effekt ließ sich in gleichem Maße bei Kontrollpersonen und bei Atopikern ablesen; und innerhalb der Patientengruppe zeichneten sich die Personen, bei denen spezifische IgE-Antikörper gegen die jeweils verwendeten Allergene gefunden worden waren, nicht gegenüber den Antikörper-negativen aus.

Ein erkennbares Muster, wie durch ein bestimmtes Allergen die Stimulation der drei Mitogene oder umgekehrt die Antwort einer bestimmten mitogenen Substanz durch die drei Allergene verändert werden konnte, ließ sich daraus nicht ableiten. Für jede Kombination ergab sich ein eigenes Profil mit unterschiedlich stark ausgeprägter Tendenz zur Hemmung. Einige Kulturansätze stachen dabei entweder durch fehlende positive oder durch starke negative Reaktionen hervor, nämlich die mit PWM/K1 (Kombination von PWM mit Katzenepithel in der Konzentration 1), PWM/G1 (PWM und Gräserpollen in der Konzentration 1), ConA/K1 und ConA/D1

(Con A mit Katzenepithel und Hausstaubmilbe, jeweils in den Konzentrationen 1). Das auffälligste Ergebnis fanden wir in $K_{ConA/K1}$, in der die Hemmung besonders betont war und in der der Unterschied zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ statistisch signifikant war. Die Con A-Kulturen der Atopiker wiesen hier eine noch stärkere Hemmbarkeit durch Katzenepithel auf als die der Gesunden.

Beim Vergleich der zwei verschiedenen Allergenkonzentrationen A1 und A2 in den Mitogenkulturen, bei denen A1 die 1:10-, A2 die 1:100-Verdünnung der Allergenstammlösungen waren, stellten wir im allgemeinen in den Mitogenkulturen mit den niedrigeren Allergenkonzentrationen A2 höhere Zählraten fest als in den mit den höheren Konzentrationen A1. Demnach konnten die Allergene die Mitogenstimulationen in den höheren Konzentrationen stärker hemmend beeinflussen. Eine Ausnahme bildete die Kombination PHA/K2, in der die Werte gegenüber PHA/K1 noch weiter abfielen. Diese Charakteristik war in beiden Gruppen gleichermaßen ausgebildet.

Wenn wir eine Analyse der Ergebnisse einzelner Personen durchführten (im Ergebnisteil mußten diese Informationen wegen der verallgemeinernden statistischen Darstellung verlorengehen), beobachteten wir gelegentlich auch verstärkte Proliferationen in Mitogen/Allergen-Kulturen im Vergleich mit Mitogen-Kulturen. Es konnte jedoch auch bei diesen Personen nicht auf gesetzmäßige Strukturen geschlossen werden. Wenn also ein Allergen zusammen mit einem Mitogen zu einer verstärkten Antwort der Zellkultur führte, verursachte es mit einem anderen eine Abschwächung der Reaktion; wenn, von der gleichen Antwort verschiedener Versuchspersonen im selben Kulturansatz ausgehend, andere Ansätze beurteilt wurden, konnten keine Parallelen entdeckt

werden.

Da die Allergenkonzentration im Zusammenwirken mit den Mitogenen von Bedeutung ist, - wie die stärkere Beeinträchtigung der PHA-Stimulation durch das niedriger dosierte Allergen K2 (Katzenepithel, Verdünnung 1:100) gegenüber K1 (Verdünnung 1:10) zeigt, während sonst die höheren Allergenkonzentrationen größere Wirkungen entfalteten - könnten möglicherweise für jede Kombination aus Mitogenen und Allergenen Konzentrationsoptima bestehen, die Unterschiede deutlicher machen könnten. Wir untersuchten nur relativ hohe Konzentrationsbereiche der Allergene; in weiteren Arbeiten soll geklärt werden, ob eventuell Allergene in wesentlich niedrigeren Konzentrationen stimulierende Wirkungen ausüben. Auch sollten anstelle der Allergenextrakte, die zahlreiche unbekannte Stoffe und zum Teil Irritantien enthalten, reine Allergene eingesetzt werden (Dissertation H. Josupeit, in Vorbereitung).

Möglicherweise wird das Verhalten der durch Mitogene aktivierten Zellen gegenüber Allergene durch individuelle, unbekannte Faktoren bestimmt; ähnliche Erfahrungen sind von pharmakologischen Stimuli bekannt, wie man sie bei den Veränderungen des Lymphozytentransformationstestes durch Glukokortikoide machen mußte (7).

Es bestand weiterhin die Möglichkeit, daß andere als die allergenen Stoffe in den Allergenextrakten die von uns beobachtete Hemmung bewirkte. Für Phenol - das dabei im Vordergrund unserer Überlegungen stand - konnte mittlerweile gezeigt werden, daß es in der Konzentration, in der es von uns eingesetzt worden war, eine solche Reaktion nicht auslöst (Arbeiten im Allergologischen Labor der Dermatologischen Klinik der LMU München, nicht ver-

öffentlicht). Die Unterschiede, die zwischen den verschiedenen Allergenlösungen in Erscheinung traten, könnten z. B. auch auf einem unterschiedlichen Histamingehalt der Extrakte beruhen. Die Klärung dieser Fragen muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Wir können überdies nicht absehen, welche Bedeutung das Phänomen, daß Allergene in vitro lymphozytäre Reaktionen - und besonders bei Atopikern - hemmen können, für die Erklärung der bekannten zellulären Immunschwäche bei Atopikern gewinnt.

Zusammenfassend nehmen wir an, daß die Allergenextrakte die Reaktionen der Zellen auf Mitogene in unspezifischer, vorzugsweise supprimierender Weise veränderten. Gegenüber den beiden anderen Allergenen müssen wir das Allergen " Katzenepithel " herausstellen, da es sowohl in Verbindung mit Mitogenen wie auch für sich alleine die auffälligsten Resultate erzeugte. Die Zellproliferationen zeigten keine Abhängigkeit davon, ob im Serum der Probanden spezifische IgE-Antikörper gegen das betreffende Allergen gefunden worden waren oder nicht.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich keine Informationen über die im einzelnen an der in vitro-Antwort beteiligten Lymphozytensubpopulationen und ihre Interaktionen bei atopischen Erkrankungen gewinnen. Es leitet sich daraus die Forderung ab, definierte Subpopulationen mit reinen Allergenen in kontrollierter Form einzusetzen, ein Unternehmen, welches zur Zeit im Allergologischen Labor der Dermatologischen Klinik der LMU München in Angriff genommen wird.

4.3. In vitro IgE

4.3.1. IgE-Neusynthese in vitro

Die Frage, ob in vitro eine IgE-Neusynthese oder aber nur eine Freisetzung präformierter, intrazellulär gelagerter Immunglobuline stattfindet, ist bis heute nicht endgültig entschieden. Die meisten Experimente anderer Autoren legten jedoch den Schluß einer de-novo-Synthese von IgE in vitro nahe; z. B. konnte durch Hemmstoffe der Proteinsynthese ein Anstieg der IgE-Konzentration unterdrückt werden (113, 121, 138). Zweifel an diesem Konzept äußerten Sampson und Buckley (117). Sie stellten fest, daß Zellen, die am Tag 0 eingefroren und aufgetaut und anschließend zehn Tage in Kultur gehalten worden waren, mehr IgE in ihren Überständen aufwiesen als solche, die sofort nach dem Wiederauftauen untersucht wurden. Sie vermuteten eine langsame Freisetzung des IgE aus zytoplasmatischen Speichern und warnten davor, aus Unterschieden der IgE-Konzentrationen in den Überständen am Tag 0 und am Tag X der Kultivierung auf eine IgE-Neusynthese zu schließen. Sie forderten die Bestimmung einer " Baseline " dadurch, daß Zellen als Kontrolle am Tag 0 eingefroren, wiederaufgetaut und parallel mit den eigentlichen Kulturen inkubiert werden sollten. Als weitere Möglichkeit schlugen sie den Zusatz von Proteinsyntheseinhibitoren, z. B. Puromycin, zu den Kontrollkulturen vor (117).

Auch wir gingen in unseren Versuchen der Frage nach einer in vitro IgE-Produktion nach und kamen zu etwas anderen Ergebnissen (s. Tab. 16, S. 115). So inkubierten wir Zellen von Versuchspersonen, die eingefroren und wiederaufgetaut worden waren, unter den völlig gleichen Bedingungen wie frische, lebende Zellen in den Kulturen und fanden lediglich geringe Anstiege. Wir unternahmen dies

nach fünfmaliger Wiederholung des Einfrier-Auftau-Vorganges. Es besteht die Möglichkeit, daß durch die mehrmalige Durchführung dieser Maßnahme IgE-Antikörper durch Denaturierung oder Spaltung der Messung entgingen, so daß zu niedrige Werte bestimmt wurden. Daß die Beträge der IgE-Konzentrationen durch Einfrieren-Auftauen möglicherweise herabgesetzt werden, lassen auch die Ergebnisse des Kapitels 3.1.2.1. ablesen, da bekannte IgE-Spiegel nach Vorschaltung des Vorganges erniedrigt gemessen wurden. Wir sahen jedoch, daß die Differenzen nicht sehr hoch ausfallen, da keine wesentlichen Unterschiede zwischen einmaligem und mehrmaligem Einfrieren-Auftauen auftreten. Die Meßwerte der Zellsuspensionen bewegen sich in von den Zellpopulationen abhängigen, vorgegebenen Größenordnungen und zeigen die Tendenz eines mäßigen Abfalls mit wiederholtem Einfrieren-Auftauen.

Als die Zellsuspensionen nach dem fünften Auftauen nochmals sieben Tage lang im Brutschrank inkubiert wurden, stiegen die IgE-Spiegel in einigen Ansätzen noch geringfügig an. Dieses Phänomen läßt verschiedene Deutungen zu. Der Anstieg könnte

- durch die postulierte langsame Freisetzung präformierten IgE's,
- durch IgE-Synthese weniger Überlebender Zellen oder
- durch IgE-Synthese subzellulärer Strukturen

bedingt sein. Daneben müssen bei Betrachtung der nur geringen Unterschiede auch Meßfehler mit in Erwägung gezogen werden. Welche dieser Möglichkeiten zutrifft, kann auf Grund dieser Untersuchungen nicht entschieden werden.

Eine Synthese des IgE in den Zellkulturen erscheint wahrscheinlich, da in den Überständen nach siebentägiger Kultur Werte bis zum 15-fachen der Ausgangswerte zum Zeit-

punkt 0 nachzuweisen waren. Die " präformierten " IgE-Spiegel bewegten sich in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 0,79 U/ml, während die Werte in den Überständen der nicht stimulierten Kulturen (" Spontan-Synthese ") zwischen 0,15 U/ml und 11,97 U/ml lagen (dabei sind die Werte des " präformierten " IgE's schon subtrahiert). Dies läßt sich nicht durch eine reine Freisetzung schon gebildeten IgE's erklären. Genauere Einblicke sollten Untersuchungen mit Hemmstoffen der Proteinsynthese (z. B. Cycloheximid, Promycin) und der DNA-Synthese (z. B. Mitomycin C) erlauben.

Das Problem von meßtechnischen Unzulänglichkeiten stellt sich bei diesen Versuchen sicherlich nicht, da die Differenzen, die hier auftraten, weit über das Maß hinausgehen, das wir bei der Beurteilung der Genauigkeit des PRIST als kritisch gefunden haben.

4.3.2. Vergleich der in vitro IgE-Werte bei Atopikern und Kontrollpersonen

Deutliche Unterschiede der IgE-Konzentrationen wurden zwischen den Zellkulturen der Patienten und der Vergleichspersonen beobachtet. Es wurden jeweils die maximalen und die minimalen in vitro IgE-Werte in den Kulturen aller Versuchspersonen aufgelistet - die Aufstellung erfolgte unabhängig von bestimmten Kulturansätzen - und die Verteilungen dieser Werte in den beiden Gruppen geprüft. 13 der Maxima und 14 der Minima bei den Patienten erbrachten höhere Ergebnisse als die größten entsprechenden Werte bei den Kontrollpersonen. Dies führte zur Feststellung hoch signifikanter statistischer Unterschiede zwischen den zwei Gruppen sowohl für die maximalen wie für die minimalen Werte ($p < 0,001$). Die in vivo bekannte IgE-Erhöhung im Serum von Atopikern ließ sich also auch in unserem Modell

in vitro fassen.

Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Plasma-IgE und IgE in den Überständen der Leerkulturen (K_0' , " spontane IgE-Sekretion ") bei Atopikern, wenn beide Werte in logarithmischer Form aufgetragen wurden. Wir verzichteten bei der Darstellung dieses Zusammenhangs bewußt auf die Berücksichtigung der Werte der Kontrollpersonen, da diese sich in einem engen Bereich um den Nullwert konzentriert hätten und die Korrelation noch stärker positiv beeinflußt hätten. Wir müssen auf Grund dieser Ergebnisse anderen Autoren widersprechen, die zwar ebenso starke Unterschiede zwischen Normalkollektiv und Patientenkollektiv, aber keine oder nur eine grobe Korrelation zwischen Plasma-IgE und in vitro IgE gefunden haben (s. folgende Tabelle 42).

Anzahl der Patienten	Lymphozytenkulturen	Dauer der Inkubation	r	Literatur
15	bei allen Auto- ren Zellen weder fraktio- niert (PBL) noch stimuliert (" spontane IgE-Sekretion ")	7 Tage	0,047	Fiser, Buckley, 1979
21		7 Tage	0,516	Romagnani et al. 1980
Berechnung bei nur 6 möglich		24 h, dann 6 Tage in frischem Medium	- 0,29	Urena et al. 1979
15		7 Tage	0,722	eigene Ergebnisse

Tab. 42: Angaben über die Korrelation von Plasma-IgE und in vitro IgE in der Literatur und eigene Werte. Die Korrelationskoeffizienten r errechneten wir aus den dekadischen Logarithmen der in den Arbeiten angegebenen Einzelwerte.

4.3.3. IgE in den Zellkulturen der Patienten

4.3.3.1. Stimulation mit Mitogenen

Der Einfluß von Mitogenen auf die in vitro IgE-Konzentrationen wurde nach Art eines " Stimulationsindex " untersucht, wobei als Bezugswerte immer die IgE-Spiegel aus den Leerkulturen (K'_0) der betreffenden Patienten dienten. Der Vergleich mit den Kontrollpersonen erübrigte sich hier und hätte sogar ein falsches Bild geliefert, da in deren Kulturüberständen häufig kein IgE oder nur in so geringen Mengen nachweisbar war, daß minimale absolute Änderungen sehr starke Variationen der Indices (relative Werte) verursacht hätte. Dieses Problem stellte sich natürlich ebenso, wenn die Atopikergruppe für sich betrachtet wurde. Bei kleinen Differenzen der niedrigen Werte konnten die Quotienten erheblichen Schwankungen unterworfen sein. Wir gingen diesen Schwierigkeiten aus dem Weg, indem wir auf eine Quantifizierung verzichteten (dies geschah auch wegen der großen interindividuellen Variabilität der absoluten Werte) und einen qualitativen Test durchführten, der nur Auskunft darüber gab, ob die IgE-Spiegel der Mitogenkulturen von denen der zugehörigen Leerkulturen verschieden waren.

Bei keinem der drei verwendeten Mitogene konnte ein derartiger Unterschied gezeigt werden. Die IgE-Konzentrationen in den Mitogenkulturen erreichten zwischen ca. 50 % und 280 % der zugehörigen Leerkulturen, im Durchschnitt aller Personen lagen sie in den gleichen Größenordnungen wie die Bezugswerte mit geringfügigen Schwankungen für die verschiedenen Mitogene. Am ehesten konnte man PHA einen fördernden, Con A einen hemmenden Effekt zuschreiben, während PWM die IgE-Antwort weder positiv noch negativ veränderte.

Dieses Ergebnis unserer Arbeit ist besonders interessant im Vergleich zur teilweise sehr diskrepanten Literatur über die IgE-Antwort nach Mitogenstimulation. Dabei wird die Bedeutung des Mitogens PWM im Zusammenhang mit der IgE-Synthese besonders kontrovers diskutiert (s. Tabelle 43, S. 183), während über Con A und PHA nur wenige Arbeiten zur Verfügung stehen. Letztere Mitogene erwiesen sich gegenüber der *in vitro* IgE-Produktion bei Patienten mit Hyperimmunglobulinämie E (98) bzw. atopischem Ekzem (60) als wirkungslos oder hemmend.

Bei den Immunglobulinklassen M, G und A allerdings besitzt PWM als polyklonales B-Zell-Stimulans sehr gute stimulierende Fähigkeiten (25, 42, 68, 69, 103, 116, 143). Zwischen verschiedenen Individuen schwankten die Meßwerte zwar in einem weiten Bereich bei allen diesen Immunglobulinklassen, doch konnten sie bei wiederholten Bestimmungen derselben Versuchspersonen gut reproduziert werden; in den mit PWM stimulierten Kulturen waren die Immunglobulin-Spiegel deutlich gegenüber den nicht stimulierten erhöht. Wir selbst bestimmten in verschiedenen Ansätzen unserer Kulturen IgG und können diese Beobachtungen bestätigen. Diese Versuche konnten an dieser Stelle nicht näher dargestellt werden. In anderen Untersuchungen konnten in unserem Labor die erwarteten Steigerungen der IgG- und IgM-Spiegel gleichfalls nachgewiesen werden (Ring, Rieber, in Vorbereitung).

Weniger klar war man sich über die Rolle des PWM in der IgE-Produktion. Es wurden ihm entweder stimulierende Eigenschaften, eine indifferente Stellung oder suppressierende Fähigkeiten zugeschrieben (s. Tabelle 43). Bisweilen kamen dieselben Autoren in verschiedenen Arbeiten zu unterschiedlichen Ansichten. Buckley und Becker (15) beobachteten eine Hemmung der IgE-Sekretion bei Atopikern

Stimulation	Kein Effekt	Suppression
Nonaka et al. 1981	Fiser, Buckley 1979	Romagnani et al. 1980
Saxon et al. 1980	Mitsuya et al. 1983	Saxon et al. 1980
Zuraw et al. 1981	Romagnani et al. 1980	Tjio et al. 1979
	Saryan et al. 1983	

Tab. 43: Literaturangaben über das Wirkungsspektrum von PWM bei der in vitro IgE-Sekretion

und eine Steigerung bei Normalpersonen. In Zusammenarbeit mit Fiser konnte Buckley den positiven Effekt von PWM auf Zellen der Gesunden nicht mehr feststellen (39). Saxon berichtete gleichfalls von einer Suppression der IgE-Synthese bei Atopikern (121) und einer Verstärkung bei Normalpersonen (120).

Die Wirkung von PWM auf die Immunglobulinproduktion von B-Zellen wird vermutlich durch lösliche Produkte vermittelt, die von regulierenden T-Zellen freigesetzt werden und zu deren Herstellung eine RNA- und Proteinsynthese, nicht jedoch eine DNA-Synthese stattfinden müssen. Daß T-Zellen die für die Regulation der Immunglobulinsynthese bestimmenden Zellen sind, wurde häufig gezeigt (55, 78, 119, 120, 121, 157). Es konnten Helferfaktoren (HF, helping factors) und Suppressorfaktoren (SF, suppressing factors) differenziert werden, die sowohl antigen-spezifisch wie antigenunspezifisch sein können (81, 101, 128).

Inwieweit diese Modell Gültigkeit für die IgE-Synthese besitzt, ist umstritten. Katz et al. beschrieben einen " suppressive factor of allergy " (SFA), den sie in Kulturen mit menschlichen Zellen entdeckten (75, 77, 157). Ein IgE-spezifischer, T-Zell-abhängiger Helferfaktor beim Menschen wurde von Saryan et al. (118) gefunden. Der Nachweis dieser Moleküle beim Menschen bestätigte schon ältere Befunde, welche in Tierexperimenten gewonnen wurden. Es wurden dabei Faktoren mit suppressierenden und verstärkenden Eigenschaften nachgewiesen, die IgE-klassenspezifisch und entweder antigenabhängig oder antigenunabhängig waren. Es handelte sich meist um Proteine mit Molekulargewichten zwischen 10 000 und 200 000 Dalton, die keiner bekannten Immunglobulinklasse angehörten, aber zum Teil IgE binden konnten (56, 63, 66, 74, 75, 80, 139).

Mögliche Ursachen unterschiedlicher Ergebnisse bei PWM-Stimulation in vergleichbaren Kulturansätzen hat Katz (74) zusammengefaßt. Er nennt die beträchtliche Variabilitäten im relativen Verhältnis von T-Suppressor- und T-Helfer-Zellen, wie sie von Saxon et al. (121) beschrieben wurden, und die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen verschiedener Individuen auf PWM, die Fauci und Pratt (38) aufgefallen waren. Katz meinte, daß reproduzierbare Werte bei PWM-Stimulation dann erzielt werden könnten, wenn es gelänge, das Kultursystem zu optimieren und zu standardisieren. Daß dabei möglicherweise auch nur die winzigsten Veränderungen des Verfahrens gewichtige Komponenten darstellen können, deutet die Vermutung an, die Verwendung von Kulturplatten mit flachen Böden oder mit abgerundeten Böden könnten die Antikörperproduktion in unterschiedlicher Weise beeinflussen (42).

Die Ursachen für die Diskrepanzen um die PWM-Wirkung auf

die IgE-Bildung in vitro konnten inzwischen weitgehend geklärt werden (Workshops " In vitro IgE synthesis " auf den Jahrestagungen der American Academy of Allergy in Miami, März 1983, und Chicago, März 1984). Die meisten Autoren verwendeten zum Nachweis von IgE selbst hergestellte Anti-IgE-Seren, die durch Immunisierung mit humanem Myelom-IgE (verschiedene Myelome) gewonnen worden waren. Spiegelberg konnte zeigen, daß einige dieser Myelome (z. B. " PS ") mit IgG kreuzreagierende Idiotypen-Strukturen besitzen, so daß das Anti-IgE diese Idiotypen auch auf Immunglobulinen dieser Klasse erkannte und somit de facto IgG gemessen wurde. Die erhöhten Werte nach PWM-Stimulation können dann nicht überraschen. Wir hatten in unserer Arbeit gleichsam das " Glück des Naiven ", als wir sie 1981 begannen. Das von uns im modifizierten PRIST verwendete Anti-IgE wird durch Immunisierung mit ϵ -Ketten aus dem Fc-Fragment eines IgE-Myeloms gewonnen, so daß wir nicht in diese " Idiotypen-Falle " treten konnten. Um so gewichtiger erscheinen uns unsere Ergebnisse, die deutlich zeigen, daß sich die IgE-Produktion in vitro von der anderer Immunglobulinklassen prinzipiell unterscheidet.

4.3.3.2. Stimulation mit Allergenen

Die Allergene wurden in der Absicht eingesetzt, die in vivo Antwort gegen diese Umweltstoffe in vitro nachzuahmen, also die IgE-Produktion zu stimulieren. Dies ist sicherlich nicht so einfach gelungen, wie wir es uns erhofft hatten. Wenn man die Gesamtheit des Untersuchungsgutes betrachtet, erfuhren die Kulturen mit Allergenen sogar zum Teil deutliche Hemmungen, oder sie blieben gleich gegenüber ihren Referenzkulturen (bei Mitogen/Allergen-Kulturen waren die Referenzen die Mitogen-Kulturen, bei den Allergenkulturen die Leerkulturen K_0^1). In manchen

Einzelfällen konnten allerdings auch beträchtliche Steigerungen der in vitro IgE-Konzentrationen durch Allergenzusatz beobachtet werden. Nur selten waren die Effekte - ob positive oder negative - über alle Allergenkulturen in gleicher Weise ausgebildet, wenn die Ergebnisse der einzelnen Versuchspersonen bewertet wurden. Es fanden sich also wiederum stark unterschiedliche, individuelle Verhaltensweisen der Zellen gegenüber den einzelnen Allergenen. Weiterhin konnten die Reaktionen der Zellen beim Einsatz desselben Allergens mit verschiedenen Mitogenen sehr variabel sein. Verschiedene Allergene hatten im Zusammenwirken mit demselben Mitogen häufig divergente Ergebnisse zur Folge. Es konnten also innerhalb der Atopikergruppe keine konstanten Wirkungen der Allergene auf die Zellkulturen aufgezeigt werden.

Es mußten demnach alle Kulturansätze für sich auf Auffälligkeiten hin untersucht werden. Katzenepithel erwies sich zusammen mit den Mitogenen PWM und PHA als supprimierend auf die IgE-Sekretion im Vergleich zu den entsprechenden Mitogen-Referenzkulturen. Bei jeweils 12 der 15 untersuchten Personen beobachteten wir diese Hemmung, die damit statistisch signifikant war ($p < 0,05$). Wie bei den Versuchen zur DNA-Synthese war Katzenepithel das hervorstechendste der drei eingesetzten Allergene bei den Untersuchungen zu den IgE-Spiegeln; insofern kann man auf eine gewisse Parallele zwischen beiden Verfahren verweisen.

Alle Allergenwirkungen waren unabhängig davon, ob spezifische IgE-Antikörper gegen die jeweiligen Allergene im Blut der Patienten aufgefunden wurden oder nicht. Atopiker mit spezifischen IgE-Antikörpern, die also sicherlich schon Kontakt mit dem Allergen gehabt hatten und deren Zellen für das Antigen geprägt waren, unterschieden sich danach nicht von solchen, die keine spezifischen IgE-Anti-

körper besaßen. Aus dem Vorhandensein oder dem Fehlen derartiger Antikörper kann man jedoch nicht auf eine " Primary Response " oder eine " Secondary Response ", also auf einen Erst- oder Zweitkontakt der Zellen mit einem Antigen schließen; RAST-negative Patienten könnten spezifische Gedächtniszellen besitzen. Dies ist wegen der ubiquitären Verbreitung der verwendeten Allergene auch fast mit Sicherheit anzunehmen.

Unglücklicherweise sind die Eigenschaften der Allergene, insbesondere ihre immunologischen, weitgehend unbekannt. Einige Hapten-Carrier-Komplexe wurden in tierexperimentellen Arbeiten und in letzter Zeit auch in ihrem Verhalten gegenüber humanen Zellen näher charakterisiert (27, 59, 74, 80, 94). Diese Forschungen ermöglichten interessante Einblicke in die Regulation der IgE-Antwort, die auch für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

Als Haptene wurden vorzugsweise DNP (Dinitrophenol) und TNP (Trinitrophenol) verwendet, die mit diversen Carriern konjugiert wurden, z. B. mit ASC (Ascaris suum-Extrakt), MYC (Mycobakterium-Extrakt; nähere Angaben waren aus der Literatur nicht zu ersehen, vermutlich handelt es sich jedoch um Extrakt von *M. tuberculosis* oder *M. kansasii*, da bei diesen Stämmen die Wachsfraction D vorkommt, die für die Adjuvanswirkung entscheidend ist.), KLH (Keyhole limpet hemocyanin) oder OA (Ovalbumin). Es wurde gezeigt, daß carrier-spezifische T-Lymphozyten, wenn sie mit ASC oder KLH geprägt worden waren, mit haptengeprägten B-Lymphozyten die Immunglobulinproduktion verstärken, also eine Helferfunktion besitzen. Helferzellen mußten darüberhinaus eine isotypische Spezifität besitzen, da IgG und IgE produziert wurden, wenn ein Aluminium-präzipitierter Carrier eingesetzt wurde, dagegen nur IgG, wenn der gleiche Carrier in CFA (complete Freund's

adjuvant) eingeschlossen war. Wegen der Existenz klassenspezifischer T-Helfer-Zellen wurde die Präsenz von isotypischen T-Suppressor-Zellen postuliert. Daß IgE-spezifische Suppressor-Zellen an der Regulation der IgE-Antwort beteiligt sind, ließen Experimente mit MYC-DNP vermuten; dieses Konjugat unterdrückte die Anti-DNP IgE-Synthese DNP-spezifischer B-Lymphozyten, während es IgG nicht beeinflusste. Der Effekt war umso stärker, je mehr MYC-DNP-sensitive T-Lymphozyten zugefügt wurden (s. Übersichtsarbeiten 74, 75, 80). In CFA ist Mycobakterium enthalten. Kishimoto schreibt deshalb: These results " suggest, that Mycobacterium activates T cells responsible for the negative regulatory control of the IgE response " (80). Ein anderer Aspekt ist, daß T-Helfer-Zellen denaturierte Antigene erkennen können, während T-Suppressor-Zellen und B-Zellen dazu nicht fähig sind. Enders und Grey (34, 35) schlossen daraus, daß sich T-Helfer-Zellen an der Primärstruktur einer antigenen Determinante zu orientieren vermögen, T-Suppressor-Zellen und B-Zellen dagegen ihre Konformation identifizieren. Damit steht möglicherweise in Zusammenhang, daß die Antigene den T-Zellen durch akzessorische Zellen, z. B. durch Monozyten, in geeigneter Form präsentiert werden müssen.

Auch in vitro scheinen Monozyten regulierend an der Immunantwort mitzuwirken. Wenn Monozyten im Übermaß monozytenarmen Lymphozytenkulturen zugeführt wurden (bis 35 %), wurde die IgG-Antwort auf polyklonale Aktivatoren fast vollständig gehemmt; einige wenige Monozyten waren aber in jedem Falle für eine optimale Immunglobulinsynthese notwendig (42). Die IgE-Konzentrationen hingegen waren erhöht, wenn mehr Monozyten in den Zellsuspensionen vorlagen, und deutlich erniedrigt, wenn ihr Anteil weniger als 5 % aller Zellen war (114).

Als bedeutendste Regulatorzellen wurden die T-Lymphozyten erkannt. Während sie vor wenigen Jahren noch auf Grund von funktionellen Unterschieden (Einfluß auf Immunglobulinsynthese etc.), durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (129) (unterschiedliche Strahlensensibilität der Subpopulationen.) oder über Fc-Rezeptoren (90) in T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen eingeteilt wurden, können sie heute mit monoklonalen Antikörpern wegen ihrer verschiedenen Oberflächenantigene isoliert werden. Ursprünglich bezog sich dieses Konzept auf Zellen mit Rezeptoren für IgM und IgG, wobei die ersten vorrangig den T-Helfer-Zellen, letztere den T-Suppressor-Zellen zuzuordnen waren (50, 90, 116). Interessanterweise waren die meisten T_H -Zellen (T-Zellen mit Rezeptoren für IgM) Theophyllin-resistent, während T_S -Zellen (T-Zellen mit Rezeptoren für IgG) Theophyllin-sensibel waren (31, 128). Durch die tierexperimentellen Arbeiten vor allem von Ishizaka, Katz und Kishimoto und deren Arbeitsgruppen wurde dann die Existenz von IgE-klassenspezifischen T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen gefordert (s. Übersichtsarbeiten 64, 74, 75, 80). Spiegelberg et al. (131) entdeckten schließlich Rezeptoren für den Fc-Anteil des IgE auch auf Lymphozyten, und die vermehrt bei Atopikern. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zellen um IgE-klassenspezifische T-Regulatorzellen beim Menschen. Ihre Anzahl war jedoch sehr klein und nicht immer nachzuweisen. Es gibt einige Hinweise dafür, daß für die Induktion von T-Suppressor-Zellen zwei unterschiedliche T-Zell-Unterklassen notwendig sind. Einen frühen Bericht darüber verfaßten Broder et al. (14). Sie stellten Versuche mit Zellen eines Kindes an, das an akuter Lymphoblastenleukämie und Agammaglobulinämie litt. Diese Zellen konnten normale B-Lymphozyten bei Anwesenheit von normalen T-Lymphozyten an der Immunglobulinsynthese hindern; die supprimierende Wirkung war aufgehoben, wenn entweder die

Leukämiezellen oder die normalen T-Lymphozyten vorher bestrahlt wurden. Die Autoren schlossen daraus auf die Notwendigkeit einer T - T-Zell-Interaktion bei der Induktion der Suppressor-Zellen. Malley und Dresser (87) beschrieben kooperierende T_{S1} - und T_{S2} -Zellen. Aus theoretischen Überlegungen heraus hat Kishimoto ebenfalls auf eine solche Möglichkeit hingewiesen (80), als er die Antigenspezifität und die Klassenspezifität von SFA und EFA (bzw. die IgE-Antwort verstärkende und supprimierende Faktoren) untersuchte.

Diese Faktoren werden von Fc ϵ -tragenden Lymphozyten gebildet; sie können an IgE binden und wirken potenzierend oder supprimierend. Ishizaka entdeckte sie in mit Nematoden (*Nippostrongylus brasiliensis*) infizierten Ratten. SFA und EFA unterscheiden sich durch ihren Gehalt an Zuckerresten; der potenzierende Faktor besitzt Glykosylreste und kann durch Bindung an Concanavalin A extrahiert werden (Con A bindet spezifisch an α -D-Mannose und α -D-Glucose, s. S. 37), dem supprimierenden Faktor fehlen die Polysaccharide. Möglicherweise hat in unseren Kulturen mit Con A, in denen wir eine Hemmung der IgE-Sekretion zu sehen glaubten, diese Kopplung eine Rolle gespielt. Durch Hemmung der Glykosylierung (z. B. durch das Antibiotikum Tunicamycin) kann die Bildung von suppressivem Faktor gefördert werden. Auch durch die Hemmung der Phospholipase (z. B. durch Lipomodulin) wird dieser Effekt erzielt. Umgekehrt führen Stoffe, die die Phospholipase aktivieren oder die Glykosylierung begünstigen, zu einer vermehrten Bildung von IgE-potenzierendem Faktor (74, 112). Es ist schon vermutet worden, daß der IgE-suppressive Faktor eine nicht-glykosylierte Variante des IgE-potenzierenden Faktors ist (74). Die Faktoren üben ihre Wirkung auf B-Lymphozyten aus, und wahrscheinlich handelt es sich bei ihnen um Botenstoffe, über die T- mit B-Zellen kommunizieren.

Aus unseren Ausführungen ergibt sich, daß eine Immunantwort völlig anders ausfällt, wenn dieselben Antigene unterschiedlich aufbereitet angeboten werden, je nachdem, welche Zelle auf diesen Reiz bevorzugt angesprochen wird und welche Bedingungen sie vorfindet. Offensichtlich verläuft die Reaktion bei einem Antigenkontakt nicht in festen, unidirektionalen Schienen nach einem Ursache-Wirkungsprinzip, sondern durch komplexe Steuerung innerhalb eines Regelkreises, in dem auch die Natur des Immunogens eine mögliches Störglied darstellen kann.

In unseren Versuchen gelang es nur selten, die IgE-Produktion durch Stimulation mit Allergenen zu steigern. Es ist müßig, darüber zu spekulieren, warum es so war, solange nicht mehr über die Allergene und ihre Wirkungen auf Lymphozytensubpopulationen bekannt ist. Wir verwendeten ein heterogenes Gemisch von mononukleären Zellen des peripheren Venenblutes, das wahrscheinlich bei den verschiedenen Patienten sehr variabel zusammengesetzt war. Wahrscheinlich beteiligen sich verschiedenste Populationen von Lymphozyten, aber auch Makrophagen, an der Immunantwort gegen die zugeführten Allergene und modulieren, unterdrücken oder fördern die IgE-Synthese. Neben den Interaktionen dieser Zellen müssen auch die immunologischen Eigenschaften von Antigenen beschrieben werden. Kulturmodelle wie unseres erscheinen geeignet, über die Bestimmung der IgE-Antwort diese Fragen weiter zu untersuchen.

4.3.4. In vivo-Stimulation der IgE-Synthese

Die gewonnenen Ergebnisse liefern starke Hinweise dafür, daß die in vitro IgE-Synthese in erster Linie von der in vivo ausgebildeten Grundsituation der Zellpopulationen im Blut der einzelnen Patienten abhängig ist und sich in vitro durch Mitogene oder Allergene nur in unspezifischer

Weise beeinflussen läßt. Für diese These spricht die positive Korrelation zwischen Serum-IgE und in vitro-IgE; möglicherweise besteht in vivo ein bestimmter Aktivierungszustand der Zellen, der auch in vitro beibehalten wird und der nicht einfach abgeschaltet werden kann. Katz entwarf 1978 ein Konzept, das er " concept of ' allergic breakthrough ' " (75, 76) nannte, in dem er sich mit der Enthemmung der IgE-Regulation befaßte. Normalerweise, nahm er an, sei das System so ausgestattet, daß die IgE-Spiegel durch einen Dämpfungsmechanismus niedrig gehalten würden. Er fuhr fort: " However, if (1) any one of a number of possible perturbations disturb the damping mechanism in such a way as to diminish the overall damping capabilities to a sufficiently low level, and if (2) at that point in time when the damping threshold is lowered, the individual becomes sensitized to one or more allergenic substances, this unfortunate juxtaposition in time can result in allergic breakthrough. This simply means that the height of the IgE antibody production ... rises to excessive quantities ... " Weiter führte er aus: " Once breakthrough has occurred, the height of the IgE antibody production should remain elevated even though the damping mechanism has returned to its normal threshold level. " (75, S. 12, S. 15) Im gleichen Sinne interpretierten wir unsere Resultate, als wir feststellten, daß die IgE-Spiegel in den diversen Kulturansätzen der einzelnen Probanden relativ konstant waren, aber zwischen den Versuchspersonen stark streuten. Die Höhe der in vitro IgE-Produktion war also vor allem eine Eigenschaft, die den Zellen eines bestimmten Individuums zuzuschreiben war und die durch Manipulationen in vitro nicht oder nur geringfügig modifizierbar war - und wenn, dann nur in uncharakteristischer Weise.

Eine weitere Unterstützung der These erfuhren wir, als wir spezifische IgE-Antikörper zu bestimmen versuchten. Bei einem Patienten wurden IgE-Antikörper gegen Hausstaubmilbe in der Leerkultur und in der mit Gräserpollen stimulierten Kultur nachgewiesen (beide Male RAST-Klasse 2 in vitro). Spezifische IgE-Antikörper gegen Gräser wurden hingegen in beiden Kulturen nicht gefunden. Durch die Stimulation mit Gräsern in vitro konnten wir also keine Steigerung des Anti-Gräser-IgE erreichen. Vielmehr wurden spezifische IgE-Antikörper gegen Milben in Kulturen hergestellt, die nicht oder mit einem anderen Allergen provoziert worden waren. Daraus folgt, daß die Zellen schon vor der Kultivierung, in vivo, den Stimulus zur Antikörper-Produktion erfahren haben mußten.

Ein gewisses methodisches Problem bei diesem Versuch, in dem es nicht gelungen ist, spezifische IgE-Antikörper gegen ein Allergen nach Provokation mit diesem Stoff zu entdecken, liegt darin, daß Antigen und Antikörper eine Bindung eingegangen haben könnten und dadurch im RAST die spezifischen IgE-Antikörper wegen der Blockade der Paratope nicht mehr erfaßt werden konnten. Zu einer Lösung könnte man kommen, indem man Reinkubationsversuche durchführt; die Zellen sollten eine gewisse Zeit mit Allergen inkubiert werden (ca. 24 Stunden), dann mehrmals gewaschen und schließlich mit frischem Medium erneut kultiviert werden.

Im übrigen haben auch andere Autoren, die unter etwas anderen Voraussetzungen ähnliche Versuche durchführten, die gleichen Erfahrungen machen müssen wie wir. Sie kamen ebenfalls zu dem Schluß, die in vitro IgE-Synthese sei durch Vorgänge, die sich in vivo ereigneten, in Gang gesetzt worden (39, 57, 113, 138).

4.3.5. Ausblick

Wir zeigten in unserer Arbeit, daß in Zellkulturen von Patienten mit atopischem Ekzem und erhöhten Serum-IgE-Spiegeln IgE mit einfachen Methoden zuverlässig und sicher nachgewiesen werden kann. Es ist aber mit diesem System, in dem die durch Dichtezentrifugation isolierten Zellen aus dem peripheren Venenblut nicht näher charakterisiert oder gar in konstantem Verhältnis eingesetzt wurden, nicht gelungen, eine eindeutige Stimulation der IgE-Synthese durch unspezifische (Mitogene) oder spezifische (Allergene) Reize zu erreichen. Es gilt also, die Wechselwirkungen von Zellsubpopulationen durch Vereinfachung des Kultursystems sowie Einsatz reiner Allergene zu untersuchen, um Aufschluß über die Regulation der IgE-Antwort zu erhalten und auch um möglicherweise Querverbindungen mit anderen Befunden der Atopie herstellen zu können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Venenblut von 15 Patienten mit atopischem Ekzem und von 14 Kontrollpersonen wurden sieben Tage lang in Kultur gehalten. Die Zellen wurden mit Allergenen und mit Mitogenen stimuliert. Nach der Inkubationsperiode wurden die DNA-Synthese durch Markierung mit Methyl-³H-Thymidin (Lymphozytentransformationstest, LTT) und die IgE-Konzentrationen in den Überständen der Kulturen mit einem modifizierten Radioimmunoassay (PRIST) gemessen. Daneben wurden Versuche zur Kinetik des LTT und der in vitro IgE-Sekretion ausgeführt. Vergleichend wurden PRIST (RIA) und ein Enzymimmunoassay (Enzygnost) als Meßmethoden des IgE auf ihre Güte überprüft. Dabei erwies sich die von uns verwendete Modifikation des PRIST als überlegen. Mit ihr konnten zuverlässig IgE-Konzentrationen bis 0,1 U/ml bestimmt werden. Schließlich wurde versucht, spezifische IgE-Antikörper in Lymphozytenkulturen ausgewählter Patienten zu messen, was auch in Einzelfällen gelang; in der Mehrzahl lagen die Konzentrationen jedoch in so niedrigen Bereichen, daß neue Testverfahren zu diesem Zweck erarbeitet werden müssen.

Im LTT zeigten Zellen von Atopikern im Vergleich zu Kontrollpersonen nach Stimulation mit PWM erhöhte Thymidineinbauraten. Eine eindeutige Stimulation durch Allergene gelang in keiner der beiden Gruppen. Vielmehr wirkten die Allergene vorwiegend hemmend auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation, in den höheren Konzentrationen war dieser Effekt im allgemeinen stärker ausgeprägt. Am größten war diese Wirkung unter den drei verwendeten Allergenen bei Katzenepithel. Auffälligerweise trat bei den Atopikern gegenüber den Kontrollpersonen eine durch Katzenepithel induzierte, signifikant stärkere Hemmung der Con A-stimulierten Lymphozyten ein. Es konnte keine Bezie-

hung zwischen der Proliferationsrate der Zellen in den Allergenkulturen und spezifischen IgE-Antikörpern im Serum der Patienten entdeckt werden. Der Einfluß von Allergenen auf den LTF wurde als unspezifisch, vorzugsweise supprimierend erachtet.

Mit dem von uns modifizierten PRIST-Verfahren konnten auch niedrige IgE-Spiegel in den Überständen der Zellkulturen gut bestimmt werden. In den Kulturen der Patienten waren in fast allen Ansätzen höhere IgE-Spiegel nachzuweisen als in denen der Kontrollpersonen ($p < 0,001$). Bei den Atopikern fand sich eine deutliche positive Korrelation zwischen Serum-IgE und spontaner in vitro IgE-Sekretion in den Leerkulturen ($r = 0,722$, $p < 0,01$). Eine aktive Syntheseleistung der Zellen war wegen der starken Differenzen der IgE-Werte vor und nach Kultur offenkundig, zumal auch die intrazellulär gelagerten IgE-Moleküle keinen wesentlichen Beitrag zu den in den Überständen gemessenen Werten lieferten. Durch Einsatz von Mitogenen und Allergenen wurde die in vitro IgE-Produktion nicht gesteigert, sondern eher gehemmt; statistisch signifikante Hemmungen wurden in PWM- und PHA-Kulturen durch Katzenallergen gefunden ($p < 0,05$). Das Ausmaß der Differenzbeträge bei den verschiedenen Ansätzen einer gegebenen Zellpopulation war gering; wahrscheinlich war die Höhe der IgE-Sekretion eine den verschiedenen Zellsuspensionen der Patienten innewohnende Eigenschaft, die durch in vivo-Vorgänge determiniert war und durch Manipulationen in vitro nur wenig beeinträchtigt oder stimuliert werden konnte.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß in Zellkulturen von Patienten mit atopischem Ekzem IgE-Antikörper genau und zuverlässig meßbar sind, bietet sich dieses Modell zur Untersuchung der Mechanismen der IgE-Regulation beim Menschen an. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse könnten möglicher-

weise von großer Bedeutung für unser Wissen um die Pathogenese und um neue therapeutische Ansätze der atopischen Erkrankungen sein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ALANI M., HJORTH N.
Sensitivity to house-dust mites in atopic dermatitis.
Acta Allergol. 25 (1970) 41

- (2) ALANI M., HAARLØV N.
The house dust mite: A possible source of allergen in
the environment of patients with atopic dermatitis.
J. Nat. Med. Ass. 64 (1972) 302

- (3) ANDERSSON J., MÖLLER G., SJÖBERG O.
B lymphocytes can be stimulated by Concanavalin A in
the presence of humoral factors released by T cells.
Eur. J. Immunol. 2 (1972) 99 - 101

- (4) ANDERSSON J., EDELMAN G.M., MÖLLER G.
Activation of B lymphocytes by locally concentrated
Concanavalin A.
Eur. J. Immunol. 2 (1972) 233 - 235

- (5) BAIN B.
Tritiated-Thymidine uptake in mixed leucocyte cultures:
Effect of specific activity and exposure time.
Clin. Exp. Immunol. 6 (1970) 255 - 262

- (6) BENCARD-ALLERGIE-DIENST
Liste der Bencard-Allergene (1980)

- (7) BLOMGREN H.
Steroid sensitivity of the response of human lympho-
cytes to Phytohemagglutinin and Pokeweed Mitogen: Role
of phagocytic cells.
Scand. J. Immunol. 3 (1974) 655 - 664

- (8) BODGER M.P., MCGIVEN A.R., FITZGERALD P.H.
Mitogenic proteins of Pokeweed.
I. Purification, characterization and mitogenic activity of two proteins from Pokeweed (*Phytolacca Octandra*).
Immunology 37 (1979) 785 - 792
- (9) BODGER M.P., MCGIVEN A.R., FITZGERALD P.H.
Mitogenic proteins of Pokeweed.
II. The differentiation of human peripheral blood B lymphocytes stimulated with purified Pokeweed Mitogens (Po-2 and Po-3) from Pokeweed, *Phytolacca Octandra*.
Immunology 37 (1979) 793 - 799
- (10) BORJESON J., REISFELD R., CHESSIN L.N., WELSH P.D., DOUGLAS S.D.
Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro.
I. Biological and physicochemical properties of the Pokeweed Mitogen.
J. Exp. Med. (1966) 859 - 872
- (11) BOYUM A.
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 suppl. 97 (1968) 77 - 89
- (12) BRATESCU A., TEODORESCU M.
Circannual variations in the B cell / T cell ratio in normal human peripheral blood.
J. Allergy Clin. Immunol. 68 (1981) 273 - 280
- (13) BRAUN-FALCO O., PLEWIG G., WOLFF H.H.
Dermatologie und Venerologie.
S. 313, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1984)

- (14) BRODER S., POPLACK D., WHANG-PENG J., DURM M.,
GOLDMAN C., MUUL L., WALDMANN T.A.
Characterization of al suppressor-cell leukemia.
Evidence for the requirement of an interaction of
two cells in the development of human suppressor
effector cells.
N. Engl. J. Med. 298 (1978) 66 - 72
- (15) BUCKLEY R.H., BECKER W.G.
Abnormalities in the regulation of human IgE syn-
thesis.
Immunol. Rev. 41 (1978) 288 - 314
- (16) BUNDSCHUH G., SCHNEEWEIS B.
Immunologie.
Gustav Fischer, Stuttgart, New York (1979)
- (17) BUSSE W.W., LEE T.-P.
Decreased adrenergic responses in lymphocytes and
granulocytes in atopic eczema.
J. Allergy Clin. Immunol. 58 (1976) 586 - 596
- (18) CHESS L., BREARD J., STUART A.L., SCHLOSSMAN S.F.
Differential triggering of human lymphocyte subpo-
pulations by plant lectins and T cell products.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim,
D.L. Rosenstreich, eds.) S. 153 - 159, Academic
Press, New York, San Francisco, London (1976)
- (19) CHESS L., MACDERMOTT R.P., SCHLOSSMAN S.F.
Immunologic functions of isolated human lymphocyte
subpopulations.
I. Quantitative isolation of human T and B cells and
response to mitogens.
J. Immunol. 113 (1974) 1113 - 1121

- (20) CHESSIN L.N., BÖRJESON J., WELSH P.D., DOUGLAS S.D., COOPER H.I.
Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro.
II. Morphological and biochemical studies on the transformation of lymphocytes by Pokeweed Mitogen.
J. Exp. Med. 124 (1966) 873
- (21) COCA A.F., COOKE R.A.
On the classification of the phenomenon of hypersensitiveness.
J. Immunol. 8 (1923) 163 - 182
- (22) COHNEN G., AUGENER W., REUTER A., BRITTINGER G.
Peripheral blood T and B lymphocytes in men in different age groups.
Z. Immun.-forsch. 149 (1975) 463 - 468
- (23) COOPER D.A., DUCKETT M., HANSEN P., PETTS V., PENNY R.
Glucocorticoid enhancement of immunoglobulin synthesis by pokeweed mitogen-stimulated human lymphocytes.
II. T lymphocyte independence.
Clin. Exp. Immunol. 44 (1981) 129 - 136
- (24) CRUMPTON M.J., AUGER J., GREEN N.M., MAINO V.C.
Surface membrane events following activation by lectins and calcium ionophore.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, eds.) S. 85 - 101, Academic Press, New York, San Francisco, London (1976)
- (25) CUNNINGHAM B.A., SELA B.-A., YAHARA I., EDELMAN G.M.
Structure and activities of lymphocyte mitogens.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, eds.) S. 13 - 30, Academic Press, New York, San Francisco, London (1976)

- (26) DAHL M.V.
Atopic dermatitis.
In: Clinical Immunodermatology, S. 232 - 237
Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, London (1981)
- (27) DELFRAISSY J.-F., GALANAUD P., DORMONT J., WALLON C.
Primary in vitro antibody response from human peripheral blood lymphocytes.
J. Immunol. 118(2) (1977) 630-635
- (28) DIEM K., LENTNER C.
Documenta Geigy
Wissenschaftliche Tabellen.
Thieme, Stuttgart (1975)
- (29) DIXIT I.P.
Dust-mite urticaria.
Practitioner 210 (1973) 664
- (30) DOBLOUG J.H., FØRRE Ø., LEA T., SOLHEIM B.G.,
NATVIG J.B.
Detection of Fc-receptor-bearing human lymphocytes.
The majority of T_H cells carry HLA-DR antigens.
Clin. Immunol. Immunopathol. 19 (1981) 224-237
- (31) DOSCH H.H., SHORE A., GELFAND E.W.
Regulation of the specific plaque-forming cell response in man: Restraint of B cell responsiveness.
Eur. J. Immunol. 9 (1979) 702-707
- (32) DOUGLAS S.D., HOFFMAN P.F., BØRJESON J., CHESSIN L.N.
Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro.
III. Fine structural features of lymphocyte transformation by Pokeweed Mitogen.
J. Immunol. 98 (1967) 17

(33) DUTTON R.W.

The nonspecific T cell signal.

In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, eds.) S. 237-243, Academic Press, New York, San Francisco, London (1976)

(34) ENDERS R.O., GREY H.M.

Antigen recognition by T cells.

I. Suppressor T cells fail to recognize cross-reactivity between native and denatured ovalbumin.

J. Immunol. 125 (1980) 1515

(35) ENDERS R.O., GREY H.M.

Antigen recognition by T cells.

II. Intravenous administration of native or denatured ovalbumin results in tolerance to both forms of the antigens.

J. Immunol. 125 (1980) 1521

(36) ESKOLA J., FREY H., MOLNAR G., SOPPI E.

Biological rhythm of cell-mediated immunity in man.

Clin. Exp. Immunol. 26 (1976) 253-257

(37) FARNES P., BARKER B.E., BROWNHILL I.E., FANGER H.

Mitogenic activity in *Phytolacca americana* (Pokeweed).

Lancet 2 (1964) 1100

(38) FAUCI A.S., PRATT K.R.

Polyclonl activation of bone-marrow-derived lymphocytes from human peripheral blood measured by a direct plaque-forming cell assay.

Proc. Natl. Acad. Sci. 73 (1976) 3676-3679

- (39) FISER P.M., BUCKLEY R.H.
Human IgE biosynthesis in vitro: Studies with atopic and normal blood mononuclear cells and subpopulations.
J. Immunol. 123 (1979) 1788-1794
- (40) GIGLI I., BAER R.L.
Atopic Dermatitis.
In: Dermatology in General Medicine (T.B.Fitzpatrick, A.Z. Eisen, K. Wolff et al., eds.), McGraw-Hill Book Company, New York (1979), p. 520-528
- (41) GMELIG-MEYLING F., UYTDEHAAG A.G., BALLIEUX R.E.
Human B-cell activation in vitro.
T-cell-dependent Pokeweed Mitogen-induced differentiation of blood B lymphocytes.
Cell Immunol. 33 (1977) 156-169
- (42) GMELIG-MEYLING F., WALDMANN T.A.
Human B cell activation in vitro: Augmentation and suppression by monocytes of the immunoglobulin production induced by various B cell stimulants.
J. Immunol. 126 (1981) 529-537
- (43) GREAVES M., JANOSSY G., DOENHOFF M.
Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens.
J. Exp. Med. 140 (1974) 1-18
- (44) GROVE D.I., REID J.G., FORBES I.J.
Humoral and cellular immunity in atopic eczema.
Brit. J. Dermatol. 92 (1975) 611

- (45) GUNTHER G.R., WANG J.L., EDELMAN G.M.
The kinetics of cellular commitment during stimulation of lymphocytes by lectins.
J. Cell Biol. 62 (1974) 366-377
- (46) HALPERN S.R., SELLARS W.A., JOHNSON R.B., ANDERSON D.W.,
SAPERSTEIN S., REISCH J.S.
Development of childhood allergy in infants fed breast, soy or cow milk.
J. Allergy Clin. Immunol. 51 (1973) 139-151
- (47) HANIFIN J.M., LOBITZ W.C.
Newer concepts of atopic dermatitis.
Arch. Dermatol. 113 (1977) 663-670
- (48) HANIFIN J.M., BAUMANN R., ROGGE J.L.
Chemotaxis inhibition by plasma from patients with atopic dermatitis.
Clin. Res. 25 (1977) 198
- (49) HARRISON M.R., THURMAN G.B., THOMAS G.M.
A simple and versatile harvesting device for processing radioactive label incorporated into and/or released from cells in microculture.
J. Immunol. Methods 4 (1973) 11-16
- (50) HEIJNEN C.J., UYTDEHAAG F., GMELIG-MEYLING F.,
BALLIEUX R.E.
Localization of human antigen-specific helper and suppressor function in distinct T-cell subpopulations.
Cell Immunol. 43 (1979) 282-292

- (51) HEILMAN D., GAMBRILL M.R., LEICHNER J.P.
The effect of hydrocortisone on the incorporation of tritiated thymidine by human blood lymphocytes cultured with phytohemagglutinin and pokeweed mitogen.
Clin. Exp. Immunol. 15 (1973) 203-212
- (52) HEPPLER S., MACMILLAN A.L.
Purpuric dermatosis due to house-dust mite (Dermatophagoides spp.) allergy: A case report.
Clin. Allergy 3 (1973) 23
- (53) HEWITT M., BARROW G.I., MILLER D.C., TURK F., TURK S.
Mites in the personal environment and their role in skin disorders.
Brit. J. Dermatol. 89 (1973) 401
- (54) HILL H.R., QUIE P.G.
Raised serum-IgE levels and defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent bacterial infections.
Lancet 1 (1974) 183-187
- (55) HIRANO T., KURITANI T., KISHIMOTO T., YAMAMURA Y.
In vitro immune response of human peripheral blood lymphocytes.
I. The mechanism(s) involved in T cell helper functions in the Pokeweed Mitogen-induced differentiation and proliferation of B cells.
J. Immunol. 119 (1977) 1235-1241
- (56) HIRASHIMA M., YODOI J., ISHIZAKA K.
Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes.
III. IgE-specific suppressive factor with IgE-binding activity.
J. Immunol. 125 (1980) 1442-1448

- (57) HIRATANI M., MUTO K., OSHIDA Y., ITO S., KASEI M.
Lymphocyte responsiveness to *Dermatophagoides farinae* extract in mite-sensitive patients: Effect of immunotherapy on cellular proliferative response and specific immunoglobulin E antibody (RAST score).
J. Allergy Clin. Immunol. 68 (1981) 205-211
- (58) HOESSLI D.C., WAKSMAN B.H.
Present status of research on lymphocyte activating factor (LAF).
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, eds.) Academic Press, New York, San Francisco, London (1976) p. 399-413
- (59) HOFFMANN M.K.
Antigen-specific induction and regulation of antibody synthesis in cultures of human peripheral blood mononuclear cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. 77 (1980) 1139-1143
- (60) HOVMARK A.
An in-vitro study of IgE production in severe atopic dermatitis.
Acta Dermatovener. 59 (1979) 223-227
- (61) IMMICH H.
Medizinische Statistik.
F.K. Schattauer, Stuttgart, New York (1974)
- (62) ISHIKAWA I., FUKUDA Y., KITADA H., YURI T., SHINODA A., HAYAKAWA Y., SAWANO K., USUI T.
Plasma exchange in a patient with hyper-IgE syndrome.
Ann. Allergy 49 (1982) 295-297

- (63) ISHIZAKA K.
Regulation of the IgE response.
In: Progress in Immunology, vol. IV (Fougereau,
Dausset, eds.), Academic Press, New York, San
Francisco, London (1980) p. 815-828
- (64) ISHIZAKA K., ISHIZAKA T.
Physicochemical properties of human reaginic antibody.
I. Association of reaginic activity with an immuno-
globulin other than A or G globulin.
J. Allergy 37 (1966) 169-171
- (65) ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., HORN BROOK M.M.
Physicochemical properties of human reaginic antibody.
IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier
of reaginic activity.
J. Immunol. 97 (1966) 75-85
- (66) ISHIZAKA K., ISHIZAKA T.
Mechanisms of reaginic hypersensitivity and IgE
antibody response.
Immunol. Rev. 41 (1978) 109-148
- (67) JANOSSY G., GREAVES M.F., DOENHOFF M.J., SNAJDR J.
Lymphocyte activation.
V. Quantitation of the proliferative responses to
mitogens using defined T and B cell populations.
Clin. Exp. Immunol. 14 (1973) 581-596
- (68) JANOSSY G., DE LA CONCHA E.G., WAXDAL M.J.,
PLATTS-MILLS A.E.
The effects of purified mitogenic proteins (Pa-1
and Pa-2) from pokeweed on human T and B lymphocytes
in vitro.
Clin. Exp. Immunol. 26 (1976) 108-117

- (69) JANOSSY G., DE LA CONCHA E.G., LUQUETTI A.,
SNAJDR M.J., WAXDAL M.J., PLATTS-MILLS A.E.
T-cell regulation of immunoglobulin synthesis and
proliferation in Pokeweed (Pa-1)-stimulated hu-
man lymphocyte cultures.
Scand. J. Immunol. 6 (1977) 109-123
- (70) JONES G.
Lymphocyte activation.
I. Expression of Theta, H-2 and immunoglobulin deter-
minants on lymphocytes stimulated by Phytohemaggluti-
nin, Pokeweed Mitogen, Concanavalin A or histocompa-
tibility antigen.
Clin. Exp. Immunol. 12 (1972) 391-402
- (71) JONES G.
Lymphocyte activation.
II. Kinetics and specificity of the activation process
with Phytohemagglutinin and Concanavalin A.
Clin. Exp. Immunol. 12 (1972) 403-417
- (72) JONES H.E., INOUE J.C., MCGERITY J.L., LEWIS C.W.
Atopic disease and serum immunoglobulin -E.
Brit. J. Dermatol. 92 (1975) 17-25
- (73) JUHLIN L., JOHANSSON S.G.O., BENNICHT H., GUNNAR S.,
HÖGMAN C., THYRESSON A.
Immunoglobulin E in dermatoses: Levels in atopic
dermatitis and urticaria.
Arch. Dermatol. 100 (1969) 12-16

- (74) KATZ D.H.

IgE antibody responses in vitro: From rodents to man.
In: Progress in Allergy, vol. 32 (K. Ishizaka, ed.)
S. Karger, Basel, München, Paris (1982) p. 105-160

- (75) KATZ D.H.

Review: Recent studies on the regulation of IgE antibody synthesis in experimental animals and man.
Immunology 41 (1980) 1-24

- (76) KATZ D.H.

The allergic phenotype: Manifestation of ' Allergic Breakthrough ' and imbalance in normal ' Damping ' of IgE antibody production.
Immunological Rev. 41 (1978) 77-108

- (77) KATZ D.H., BARGATZE R.F., BOGOWITZ C.A., KATZ L.R.

Regulation of IgE antibody production by serum molecules.

VII. The IgE-selective damping activity of suppressive factor of allergy (SFA) is exerted across both strain and species restricted barriers.

J. Immunol. 124 (1980) 819-824

- (78) KEIGHTLEY R.G., COOPER M.D., LAWTON A.R.

The T cell dependence of B cell differentiation induced by Pokeweed Mitogen.

J. Immunol. 117 (1976) 1538-1544

- (79) KING T.P.

Immunochemical properties of some atopic allergens.

J. Allergy Clin. Immunol. 64 (1979) 159-163

- (80) KISHIMOTO T.
IgE class-specific suppressor T cells and regulation of the IgE response.
In: Progress in Allergy, vol. 32 (K. Ishizaka, ed.)
S. Karger, Basel, München, Paris (1982) p. 265-317
- (81) KONTIAINEN S., FELDMAN M.
Suppressor cell induction in vitro.
III. Antigen-specific suppression by supernatants of suppressor cells.
Eur. J. Immunol. 7 (1977) 310-314
- (82) KORTING G.W.
Zur Pathogenese des endogenen Ekzems.
Thieme, Stuttgart (1954)
- (83) KRAEMER M.J., OCHS H.D., FURUKAWA C.T., WEDGWOOD R.J.
In vitro studies of the hyper-IgE disorders: Suppression of spontaneous IgE synthesis by allogeneic suppressor T lymphocytes.
Clin. Immunol. Immunopathol. 25 (1982) 157-164
- (84) LAMERZ R., FATEH-MOGHADAM A.
Immunglobulin E.
Biochemische, immunologische Eigenschaften und klinische Bedeutung.
Klin. Wschr. 52 (1974) 1-17
- (85) LEVY R., ROSENBERG S.A.
Proteins synthesized in lymphoid cells early after activation by Phytohemagglutinin.
Cell Immunol. 7 (1973) 92-107

- (86) LOHRMANN H.-P., NOVIKOV L., GRAW R.G. Jr.
Cellular interactions in the proliferative response
of human T and B lymphocytes to phytoantigens and
allogeneic lymphocytes.
J. Exp. Med. 139 (1974) 1553-1567
- (87) MALLEY A., DRESSER D.W.
Anti-idiotypic regulation of the formation of IgE
antibody to timothy grass pollen.
II. In vitro induction of suppressor T cells in mini
marbroom cultures.
Immunology 48 (1983) 93-99
- (88) MELLSTEDT H.
In vitro activation of human T and B lymphocytes by
Pokeweed Mitogen.
Clin. Exp. Immunol. 19 (1975) 75-82
- (89) MITSUYA H., SAT M., HIRANO T., FUJIMOTO K., KAWANO F.,
KISHIMOTO S.
Evidence for a malignant proliferation of IgE-class
specific helper T cells in a patient with Sézary syn-
drome exhibiting massive hyperimmunoglobulinemia E.
Clin. Immunol. Immunopathol. 26 (1983) 171-183
- (90) MORETIA L., WEBB S.R., GROSSI C.E., LYDYARD P.M.,
COOPER M.D.
Functional analysis of two human T-cell subpopula-
tions: Help and suppression of B-cell responses by
T cells bearing receptors for IgM or IgG.
J. Exp. Med. 146 (1977) 184-200

- (91) NAGEL J.E., CHREST F.J., ADLER W.H.
Human B cell function in normal individuals of various ages.
I. In vitro enumeration of Pokeweed-induced peripheral blood lymphocyte immunoglobulin-synthesizing cells and the comparison of the results with numbers of peripheral B and T cells, mitogen responses, and levels of serum immunoglobulins.
Clin. Exp. Immunol. 44 (1981) 646-653
- (92) NASEMANN T., SAUERBREY W.
Dermatitis atopica.
In: Lehrbuch der Hautkrankheiten und venerischen Infektionen, Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1979) p. 201-205
- (93) NELSON D.S., SCHNEIDER C.N., PENROSE J.M.
Inhibition of lymphocyte transformation by products of macrophages and other cells.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London (1976) p. 477-493
- (94) NONAKA M., ZURAW B.L., O'HAIR C.H., KATZ D.H.
Stimulation of primary in vitro IgE antibody responses in cultures of human peripheral mononuclear cells.
J. Exp. Med. 153 (1981) 1574-1581
- (95) NOVODORSKY A.
A chemical approach for the study of lymphocyte activation.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London (1976) p. 43-56

- (96) NOWELL P.C.
Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in
cultures of normal human leucocytes.
Cancer Res. 20 (1960) 462-466
- (97) PASS F., LARSEN W.G., LOBITZ W.C.
The cultured lymphocytes of atopic patients.
Ann. Allergy 24 (1966) 426
- (98) PATTERSON R., SUSZKO I.M., HSU C.C.S., ROBERTS M.,
SOO H.O.
In vitro production of IgE by lymphocytes from a
patient with hyperimmunoglobulinaemia E, eosinophi-
lia and increased lymphocytes carrying surface IgE.
Clin. Exp. Immunol. 20 (1975) 265-272
- (99) PATTERSON R., SUSZKO I.M., METZGER W.J., ROBERTS M.
In vitro production of IgE by human peripheral blood
lymphocytes: Effect of Cholera Toxin and adrenergic
stimulation.
J. Immunol. 117 (1976) 97-101
- (100) PHILLIPS B., WEISROSE E.
The mitogenic response of human B lymphocytes to
Phytohemagglutinin.
Clin. Exp. Immunol. 16 (1974) 383-392
- (101) PLAYFAIR J.H.L.
Review: The role of antibody in T cell responses.
Clin. Exp. Immunol. 17 (1974) 1-18
- (102) POTTER M.R., MOORE M.
The effect of adherent and phagocytic cells on
human lymphocyte PHA responsiveness.
Clin. Exp. Immunol. 27 (1977) 159-164

- (103) PRYMA J., MUNOZ J., VIRELLA G., FUDENBERG H.
Evaluation of IgM, IgG, IgA, IgD, and IgE secretion
by human peripheral blood lymphocytes in cultures
stimulated with Pokeweed Mitogen and Staphylococcus
Cowan I.
Cell Immunol. 50 (1980) 115-124
- (104) RAJKA G.
Prurigo Besnier (Atopic dermatitis) with special
reference to the role of allergic factors.
II. The evaluation of the results of skin reactions
Acta Dermatovenereol. 41 (1961) 1-39
- (105) REINHHERZ E.L., MORETIA L., ROPER M., BREARD J.M.,
MINGARI M.C., COOPER M.D., SCHLOSSMAN S.F.
Human T lymphocyte subpopulations defined by fc
receptors and monoclonal antibodies.
J. Exp. Med. 151 (1980) 969-974
- (106) RANELLETTI F.O., PIANTELLI M., IACOBELLI S.,
MUSIANI P., LONGO P., LAURIOLO L., MARCHETTI P.
Glucocorticoid receptors and in vitro corticosteroid-
sensitivity of peanut-positive and peanut-negative human
thymocyte subpopulations.
J. Immunol. 127 (1981) 849-855
- (107) REISFELD R.A., BØRJESON J., CHESSIN L.N., SMALL P.A.
Isolation and characterization of a mitogen from
Pokeweed (*Phytolacca americana*).
Proc. Nat. Acad. Sci. 58 (1967) 2020
- (108) RING J.
Zyklisches Adenosin-3-5-Monophosphat (c-AMP) und
Allergie.
Der Hautarzt 29 (1978) 625-631

- (109) RING J.
Atopic Dermatitis: A disease of general vasoactive mediator dysregulation.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 59 (1979) 233-239
- (110) RING J., O'CONNOR R.
In vitro histamin and serotonin release studies in atopic dermatitis.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 58 (1979) 322-330
- (111) RING J., LUTZ J.
Decreased release of lysosomal enzymes from leucocytes of patients with atopic dermatitis.
J. Amer. Acad. Dermatol. 8 (1983) 378-385
- (112) RING J.
Kongressbericht: 14. Symposium des Collegium Internationale Allergologicum Sorrent, 10. bis 14. Oktober 1982.
Allergologie 6 (1983) 325-326
- (113) ROMAGNANI S., MAGGI E., DELPRETE G.F., TRONCONE R., RICCI M.
In vitro production of IgE by human peripheral blood mononuclear cells.
I. Role of IgE biosynthesis.
Clin. Exp. Immunol. 42 (1980) 167-174
- (114) ROMAGNANI S., DELPRETE G.F., MAGGI E., TRONCONE R., GIUDIZI G.M., ALMERIGOGNA F., RICCI M.
In vitro production of IgE by human peripheral blood mononuclear cells.
II. Cells involved in the spontaneous IgE production in atopic patients.
Clin. Exp. Immunol. 42 (1980) 579-588

(115) ROSENSTREICH D.L.

The macrophage requirement for mitogenic activation of T-lymphocytes.

In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London (1976) p. 385-398

(116) RÜMKE H.C., TERPSTRA F.G., OUT T.A., VOSSEN J.M., ZEIJLEMAKER W.P.

Immunoglobulin production by human lymphocytes in a microculture system: Culture conditions and cellular interactions.

Clin. Immunol. Immunopathol. 19 (1981) 338-350

(117) SAMPSON H.A., BUCKLEY R.H.

Human IgE synthesis in vitro: A reassessment.

J. Immunol. 127 (1981) 829-834

(118) SARYAN J.A., LEUNG D.Y.M., GAIF R.S.

Induction of human IgE synthesis by a factor derived from T cells of patients with hyper IgE-status.

J. Immunol. 130 (1983) 242-247

(119) SAXON A., STEVENS R.H.

Stimulation and regulation of human IgE production in vitro using peripheral blood lymphocytes.

Clin. Immunol. Immunopathol. 14 (1979) 474-478

(120) SAXON A., KAPLAN M., STEVENS R.H.

Isotype-specific human B lymphocytes that produce immunoglobulin E in vitro when stimulated by Pokeweed Mitogen.

J. Allergy Clin. Immunol. 66 (1980) 233-241

- (121) SAXON A., MORROW C., STEVENS R.H.
Subpopulations of circulating B cells and regulatory T cells involved in in vitro immunoglobulin E production in atopic patients with elevated serum immunoglobulin E.
J. Clin. Invest. 65 (1980) 1457-1468
- (122) SCHELLEKENS P.I.A., EIJSVOGEL V.P.
Lymphocyte transformation in vitro.
I. Tissue culture conditions and quantitative measurements.
Clin. Exp. Immunol. 3 (1968) 571-584
- (123) SCHNYDER U.W.
Neurodermitis - Asthma - Rhinitis.
Eine genetisch - allergologische Studie.
S. Karger, Basel (1960)
- (124) SCHÜPF E.
Störung zellvermittelter Immunreaktionen bei Neurodermitis atopica.
Verminderte Spontanrosettenbildung von T-Lymphozyten.
Dermatologica 149 (1974) 210-219
- (125) SCHUSTER D.L., PIERSON D., BONGIOVANNI B., LEVINSON A.I.
Suppressor cell function in atopic dermatitis associated with elevated immunoglobulin E.
J. Allergy Clin. Immunol. 64 (1979) 139-145
- (126) SHANKEY T.V., DANIELE R.P., NOWELL P.C.
Kinetics of mitogen-induced proliferation and differentiation of human peripheral blood B lymphocytes.
Clin. Exp. Immunol. 44 (1981) 156-166

- (127) SHARON N.
Lectins as mitogens.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London (1976) p. 31-41
- (128) SHORE A., DOSCH H.-M., GELFAND E.W.
Induction and separation of antigen-dependent T helper and T suppressor cells in man.
Nature 274 (1978) 586-587
- (129) SIEGAL F.P., SIEGAL M.
Enhancement by irradiated T cells of human plasma cell production: Dissection of helper and suppressor functions in vitro.
J. Immunol. 118 (1977) 642-647
- (130) SNYDERMAN R., BUCKLEY R.H.
Defects of monocyte chemotaxis in patients with hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection.
Clin. Res. 23 (1975) 25A
- (131) SPIEGELBERG H.L., O'CONNOR R.D., SIMON R.A., MATHISON D.A.
Lymphocytes with immunoglobulin E Fc receptors in patients with atopic disorders.
J. Clin. Invest. 64 (1979) 714-720
- (132) STINGL G., GAZZE L., CZARNECKI N., WOLFF K.
T-cell abnormalities in atopic dermatitis patients.
J. Invest. Dermatol. 76 (1981) 468-473

- (133) STRANNEGARD I.-L., STRANNEGARD Ö.
Stimulatory and inhibitory effects of cyclic AMP
on lymphocytes from atopic children.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 58 (1979) 167-174
- (134) STRANNEGARD I.-L., LINDHOLM L., STRANNEGARD Ö.
T-lymphocytes in atopic children.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 50 (1976) 684-692
- (135) STRANNEGARD Ö., STRANNEGARD I.-L.
T lymphocyte numbers and function in human IgE-
mediated allergy.
Immunological Rev. 41 (1978) 149-170
- (136) SZENTIVANYI A.
The beta adrenergic theory of the atopic abnormali-
ty in bronchial asthma.
J. Allergy 42 (1968) 203-232
- (137) TAVADIA H.B., FLEMING K.A., HUME P.O., SIMPSON H.W.
Circadian rhythmicity of human plasma cortisol and
PHA-induced lymphocyte transformation.
Clin. Exp. Immunol. 22 (1975) 190-193
- (138) TJIO A.H., HULL W.M., GLEICH G.J.
Production of human immunoglobulin E antibody in
vitro.
J. Immunol. 122 (1979) 2131-2133
- (139) TUNG A.S., CHIORAZZI N., KATZ D.H.
Regulation of IgE antibody production by serum
molecules.
I. Serum from complete Freund's adjuvant-immune do-
nors suppresses irradiation-enhanced IgE production
in low responder mouse strains.
J. Immunol. 120 (1978) 2050-2059

- (140) URENA V., GARCIA R., VELA C., ORTIZ F., LAHOZ C.
In vitro production of IgE and IgG by sensitized
human peripheral lymphocytes.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 59 (1979) 135-142
- (141) VAN BRONSWIJK J.E.
Hausstaubmilben, Vorkommen und Bedeutung.
Allergologie 2 (1978) 55-60
- (142) VOORHORST R., SPIEKSMAN F.T.M.
Fünfzehn Jahre Hausstaubmilben-Forschung in Leiden.
Allergologie 2 (1978) 93-101
- (143) WALDMANN T.A., BRODER S., DURM M., MEADE B.,
KRAKAUER R., BLACKMAN M., GOLDMAN C.
T cell suppression of Pokeweed Mitogen induced
immunoglobulin production.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L.
Rosenstreich, eds.), Academic Press, New York, San
Francisco, London (1976) p. 509-521
- (144) WANG J.L., GUNTHER G.R., MCCLAIN D.A., EDELMAN G.M.
Biochemical signals modulating lymphocyte mitogenesis.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L.
Rosenstreich, eds.), Academic Press, New York, San
Francisco, London (1976) p. 103-117
- (145) WAXDAL M.J.
Isolation, characterization and biological activities
of five mitogens from Pokeweed.
Biochemistry 13 (1974) 3671-3682

- (146) WAXDAL M.J., NILSSON S.F., BASHAM T.Y.
Heterogeneity of the Pokeweed Mitogen and the
responding lymphocytes.
In: Mitogens in Immunobiology (J.J. Oppenheim, D.L.
Rosenstreich, eds.) Academic Press, New York, San
Francisco, London (1976) p. 161-171
- (147) WEBER W.T.
Direct evidence for the response of B and T cells
to Pokeweed Mitogen.
Cell Immunol. 9 (1973) 482-487
- (148) WÜTHRICH B.
Immunologische Befunde bei endogenem Ekzem.
In: Dermatologie in Praxis und Klinik, Band II
(G.W. Korting, ed.) Thieme, Stuttgart (1980)
S. 11.73-11.86
- (149) WYBRAN J., CHANTLER S., FUDENBERG H.H.
Human blood T cells: Response to Phytohemagglutinin.
J. Immunol. 110 (1973) 1157-1160
- (150) YAHARA I., EDELMAN G.M.
Restriction of the mobility of lymphocyte immuno-
globulin receptors by Concanavalin A.
Proc. Nat. Acad. Sci. 69 (1972) 608-612
- (151) YAMAMURA M.
Standardization of lymphocyte transformation to
Phytohemagglutinin.
Clin. Exp. Immunol. 14 (1973) 457-467

- (152) YOKOYAMA K., YANU O., TERAQ T., OSAWA T.
Purification and biological activities of Poke-
weed (*Phytolacca americana*) mitogens.
Biochem. Biophys. Acta 427 (1976) 443-452
- (153) YOUNKIN L.H.
In vitro response of lymphocytes to Phytohemagglu-
tinin (PHA) as studied with antiserum to PHA.
II. Cell cycle analyses.
Exptl. Cell Res. 90 (1975) 374-380
- (154) YU D.T.Y., CLEMENTS P.J., PAULUS H.E., PETER J.B.,
LEVY J., BARNETT E.V.
Human lymphocyte subpopulation.
Effect of corticosteroids.
J. Clin. Invest. 53 (1974) 565-571
- (155) ZIGHELBOIM J., LICHTENSTEIN A., BENJAMIN D.
Response of normal subjects to mitogens.
I. Influence of adherent cells.
Clin. Immunol. Immunopathol. 19 (1981) 406-415
- (156) ZINN K.-H., BRAUN-FALCO O.
Der Lymphozytentransformationstest in der Dermato-
logie.
Der Hautarzt 27 (1976) 101-105
- (157) ZURAW B.L., NONAKA M., O'HAIR C., KATZ D.H.
Human IgE antibody synthesis in vitro: Stimulation
of IgE responses by Pokeweed Mitogen and selective
inhibition of such responses by human Suppressive
Factor of Allergy (SFA).
J. Immunol. 127 (1981) 1169-1177

7. ANHANG

7.1. Kurzbezeichnungen, Abkürzungen

Für die Bezeichnung der verschiedenen Kulturansätze und Zellsuspensionen bzw. ihrer Überstände wurden folgende Kurzformeln eingeführt:

Vollständige Zellkultursuspensionen wurden mit K bezeichnet. Ihre Überstände erhielten die Benennung K'.

Als Suffices wurden zur Kennzeichnung der Ansätze nachgestellt:

O : Leerkultur, kein Mitogen, kein Allergen.

M : Mitogen

PWM : Pokeweed Mitogen

PHA : Phytohämagglutinin

Con A: Concanavalin A

A : Allergen

K : Katzenepithel

D : Hausstaubmilbe (Dermatophagoides pteronyssinus)

G : Gräserpollen

Nach der Verdünnung der Stammlösung wurden den Allergenen die Ziffern

1 für $c_1 = 10^{-1}$,
2 für $c_2 = 10^{-2}$ und
3 für $c_3 = 10^{-3}$

zugeordnet.

Bei kombiniertem Einsatz von Mitogen und Allergen wurde dieser Kulturansatz mit dem Suffix M/A in der unbestimmten Form, in der bestimmten Form durch die jeweiligen

Mitogene und Allergene in den oben angegebenen Abkürzungen versehen. Es bedeuten danach beispielsweise

$K_{M/A}$: Zellsuspension mit Mitogen und Allergen.

$K_{PWM/K1}$: Zellsuspension mit PWM als Mitogen und Katzenepithel in der Konzentration $c_1 = 10^{-1}$ der Stammlösung als Allergen.

Nach diesem Schema richten sich alle angeführten Kurzbezeichnungen.

Folgende Abkürzungen erscheinen in der Arbeit (in alphabetischer Reihenfolge):

A	: Angström.
ARD	: Allergic respiratory disease; allergische respiratorische Erkrankung.
ASC	: Ascaris suum-Extrakt.
c	: Konzentration
C	: Counts, Zählrate.
CFA	: Complete Freund's adjuvant; komplettes Freund'sches Adjuvans.
CI	: Curie.
Cpm	: Counts per minute; Zählrate pro Minute.
Con A	: Concanavalin A.
d	: Tag(e).
DNA	: Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure.
DNP	: Dinitrophenol.
E	: Erwartungswert.
EFA	: Enhancing factor of allergy; die IgE-Antwort verstärkender Faktor.
EIA	: Enzymimmunoassay.
FCS	: Fetal calf serum; fötales Kälberserum.
GBq	: Giga-Becquerel; $1 \text{ Bq} \hat{=} 1 \text{ Kernzerfall pro Sekunde.}$
h	: Stunde(n).
HF	: Helping factor; die Ig-Synthese fördernder Faktor.
IgE	: Immunglobulin E

IgG	: Immunglobulin G
IgM	: Immunglobulin M
KLH	: Keyhole-limpet hemocyanin; Antigen einer Schneckenart.
LAF	: Lymphozyten-aktivierender Faktor ($\hat{=}$ Interleukin I).
LTT	: Lymphozytentransformationstest.
m	: Meter.
mCi	: Milli-Curie.
MeV	: Megaelektronenvolt.
mmol	: Millimol.
ml	: Milliliter.
MYC	: Mycobakterium-Extrakt.
n.b.	: nicht berücksichtigt.
NCS	: Neonatal calf serum; Serum von neugeborenen Kälbern.
n.s.	: nicht signifikant.
OA	: Ovalbumin.
PBL	: Peripheral blood lymphocytes; Lymphozyten aus dem peripheren Blut.
PHA	: Phytohämagglutinin.
PRIST	: Papier Radio immuno Sorbent Test.
PWM	: Pokeweed Mitogen.
RAST	: Radio Allergo Sorbent Test.
RIA	: Radioimmunoassay.
RNA	: Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure.
Rpm	: Rounds per minute; Umdrehungen pro Minute.
SF	: Suppressive factor; die Ig-Synthese hemmender Faktor.
SFA	: Suppressive factor of allergy; die IgE-Antwort hemmender Faktor.
T _H -Zellen:	T-Helfer-Zellen.
T _S -Zellen:	T-Suppressor-Zellen.
TNP	: Trinitrophenol.
VK	: Variationskoeffizient.

7.2. Liste der in vitro IgE-Werte nach Probanden

7.2.1. Patientengruppe

Sämtliche Konzentrationsangaben in U/ml. Alle Kulturwerte korrigiert, d. h. IgE_0 wurde von allen Werten subtrahiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8
IgE_0	0,00	0,09	0,79	0,28	0,38	0,12	0,49	0,88
K'_0	1,75	0,36	11,97	1,92	0,94	0,21	0,87	1,23
K'_{PWM}	2,11	0,21	9,15	2,68	0,79	0,29	0,99	1,14
K'_{PHA}	3,42	0,37	16,83	3,64	0,93	0,39	1,08	0,89
K'_{ConA}	2,88	0,16	14,33	3,00	0,55	0,12	0,75	0,95
K'_K	1,25	0,28	10,73	2,14	0,97	0,06	1,18	1,01
K'_D	2,15	0,24	13,45	1,82	0,62	0,17	0,92	1,03
K'_G	1,33	0,18	15,89	2,37	0,73	0,19	0,93	1,38
$\text{K}'_{\text{PWM/K}}$	1,34	0,23	11,05	2,60	0,70	0,28	0,67	0,92
$\text{K}'_{\text{PWM/D}}$	1,51	0,21	11,13	2,38	0,84	0,21	0,84	0,88
$\text{K}'_{\text{PWM/G}}$	2,26	0,25	10,79	2,47	0,57	0,22	0,64	1,06
$\text{K}'_{\text{PHA/K}}$	2,37	0,16	10,79	3,19	1,01	0,17	0,90	0,87
$\text{K}'_{\text{PHA/D}}$	3,18	0,27	12,81	3,14	0,81	0,21	1,07	0,92
$\text{K}'_{\text{PHA/G}}$	2,55	0,30	9,95	2,69	0,58	0,08	1,02	0,92
$\text{K}'_{\text{ConA/K}}$	2,13	0,16	13,29	2,93	0,68	0,22	1,00	1,14
$\text{K}'_{\text{ConA/D}}$	1,83	0,36	12,69	2,74	0,75	0,04	1,22	0,94
$\text{K}'_{\text{ConA/G}}$	2,19	0,25	11,45	2,63	0,53	0,14	0,95	0,95

	9	10	11	12	13	14	15
IgE ₀	0,26	0,34	0,17	0,38	0,00	0,11	0,05
K ₀ ⁺	0,67	0,55	0,83	2,83	0,30	0,35	0,70
K _{PWM} ⁺	0,49	0,55	0,94	2,39	0,32	0,38	0,48
K _{PHA} ⁺	0,50	0,57	0,79	2,26	0,44	0,38	0,71
K _{ConA} ⁺	0,49	0,62	0,85	1,56	0,15	0,50	0,68
K _K ⁺	0,46	0,53	0,77	2,48	0,24	0,38	0,69
K _D ⁺	0,71	0,57	0,92	2,64	0,21	0,21	1,03
K _G ⁺	0,58	0,45	1,22	2,22	0,33	0,33	1,18
K _{PWM/K} ⁺	0,43	0,47	0,81	1,34	0,21	0,35	0,67
K _{PWM/D} ⁺	0,57	0,57	0,80	1,34	0,21	0,31	0,66
K _{PWM/G} ⁺	0,43	0,43	0,89	1,33	0,21	0,51	0,85
K _{PHA/K} ⁺	0,43	0,52	0,92	1,80	0,26	0,31	0,71
K _{PHA/D} ⁺	0,52	0,59	0,87	1,84	0,19	0,42	0,83
K _{PHA/G} ⁺	0,41	0,55	0,80	2,41	0,14	0,29	0,77
K _{ConA/K} ⁺	0,38	0,50	0,78	1,84	0,18	0,50	1,14
K _{ConA/D} ⁺	0,47	0,60	0,91	2,73	0,18	0,40	0,77
K _{ConA/G} ⁺	0,46	0,61	1,20	2,13	0,15	0,34	0,49

7.2.2. Kontrollgruppe

IgE-Konzentrationen in U/ml. Die Kulturwerte sind ebenfalls um den Betrag von IgE₀ korrigiert.

	16	17	18	19	20	21	22	23
IgE ₀	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,05	0,02
K ₀	0,05				0,15	0,07	0,00	0,13
K _{PWM}	0,15				0,04	0,00		0,01
K _{PHA}	0,02				0,03	0,00		0,09
K _{ConA}	0,00				0,02	0,04		0,15
K _K	0,14				0,12	0,02		0,19
K _D	0,09				0,03	0,02		0,12
K _G	0,00				0,13	0,02	0,00	0,12
K _{PWM/K}					0,08	0,06	0,07	0,09
K _{PWM/D}					0,05	0,02	0,00	0,12
K _{PWM/G}					0,07	0,00	0,00	0,16
K _{PHA/K}					0,07	0,00	0,01	0,18
K _{PHA/D}					0,07	0,00	0,00	0,22
K _{PHA/G}					0,01	0,03	0,00	0,14
K _{ConA/K}					0,02	0,02	0,01	0,23
K _{ConA/D}	0,00				0,03	0,00	0,00	0,13
K _{ConA/G}	0,03	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,05	0,14

	24	25	26	27	28	29
IgE ₀	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K ₀ ¹	0,04	0,05	0,30	0,11	0,12	0,04
K _{PWM} ¹	0,04	0,05	0,32	0,10	0,15	0,06
K _{PHA} ¹	0,01	0,00	0,44	0,12	0,16	0,06
K _{ConA} ¹	0,03	0,05	0,15	0,09	0,14	0,06
K _K ¹	0,06	0,04	0,24	0,09	0,12	0,09
K _D ¹	0,03	0,05	0,21	0,08	0,11	0,20
K _G ¹	0,06	0,03	0,42	0,09	0,12	0,31
K _{PWM/K} ¹	0,09	0,05	0,21	0,12	0,06	0,08
K _{PWM/D} ¹	0,06	0,04	0,21	0,10	0,11	0,04
K _{PWM/G} ¹	0,05	0,06	0,21	0,09	0,08	0,06
K _{PHA/K} ¹	0,03	0,02	0,26	0,10	0,08	0,11
K _{PHA/D} ¹	0,07	0,04	0,19	0,08	0,10	0,10
K _{PHA/G} ¹	0,03	0,04	0,14	0,08	0,13	0,08
K _{ConA/K} ¹	0,03	0,02	0,18	0,11	0,14	0,07
K _{ConA/D} ¹	0,03	0,04	0,18	0,09	0,11	0,03
K _{ConA/G} ¹	0,02	0,11	0,15	0,12	0,12	0,12

7.3. Danksagung

Bei allen, die ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen und sie ermöglicht haben, will ich mich herzlich bedanken. Besonderen Dank schulde ich

- Prof. Dr. Dr. O. Braun-Falco für die Arbeitsmöglichkeit in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Prof. Dr. Dr. J. Ring für die Überlassung des Dissertationsthemas, sein anregendes und fruchtbares Interesse am Fortschreiten der Arbeit und seine immer freundliche Beratung.
- Frä. Franziska Beier, die mich mit großer Geduld in die Labortätigkeit einführte und später wesentlich dazu beitrug, die bei der Durchführung der Versuche auftretenden Schwierigkeiten zu überwinden.
- Frau Ebmeyer und Frau Heilmann, in deren Labors ein Teil der Arbeiten ausgeführt wurden und die mir manchen wertvollen Hinweis gaben.
- Meiner Gattin Ulrike für die Durchsicht des Manuskripts.
- Meiner Tochter Ina dafür, daß ich häufig meine Pflichten als Vater vernachlässigen durfte und sie mich meist ungestört arbeiten ließ.

7.4. Lebenslauf

Name : Senner

Vornamen : Herbert Wendelin

Geburtsdatum : 06. 04. 1953

Geburtsort : Kösching

Eltern : Wendelin Senner, Kaufmann, und
Ehefrau Mathilde, geb. Wittmann

Schulbildung : 1959 - 1963 Volksschule Mailing
1963 - 1973 Christoph-Scheiner-Gymna-
sium Ingolstadt
1973 Abitur

Ziviler Ersatz-
dienst : 1973 - 1975 Bayerisches Rotes Kreuz in
Ingolstadt

Studium : 1977 - 1979 RWTH Aachen
1979 - 1980 FAU Erlangen
1980 - 1983 LMU München

Abschluß : 14. 11. 1983 Staatsexamen

Ärztliche
Approbation : 18. 11. 1983

Berufstätigkeit : 1976 - 1977 Arbeiter bei AUDI NSU in
Ingolstadt
Seit Februar 1984 als Assistenzarzt im
Pathologischen Institut des Klinikums
Ingolstadt (Leiter: Prof. Dr. C. M.
Büsing)

Persönliche
Verhältnisse : Verheiratet, 1 Tochter
Zur Zeit wohnhaft in 8070 Ingolstadt
Gladiolenstr. 1

